

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**



**BIOMARCADORES FARMACOGENÉTICOS ASOCIADOS A  
EFECTOS ADVERSOS DE LA QUIMIOTERAPIA FRENTE AL  
CÁNCER COLORRECTAL**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

Lucía Cortejoso Fernández

Bajo la dirección de los doctores

Irene Iglesias Peinado  
Luis Andrés López Fernández

**MADRID, 2013**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE FARMACIA**



**BIOMARCADORES FARMACOGENÉTICOS ASOCIADOS A EFECTOS  
ADVERSOS DE LA QUIMIOTERAPIA FRENTE AL CÁNCER  
COLORRECTAL**

**TESIS DOCTORAL**

**LUCÍA CORTEJOSO FERNÁNDEZ**

**MADRID, 2013**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**





**FACULTAD DE FARMACIA**

**BIOMARCADORES FARMACOGENÉTICOS ASOCIADOS A EFECTOS  
ADVERSOS DE LA QUIMIOTERAPIA FRENTE AL CÁNCER  
COLORRECTAL**

**TESIS DOCTORAL**

**LUCÍA CORTEJOSO FERNÁNDEZ**

**Madrid, 2013**





**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**



**FACULTAD DE FARMACIA**

**TESIS DOCTORAL**

Bajo la dirección de

Dra. Irene Iglesias Peinado

Dr. Luis Andrés López Fernández

**LUCÍA CORTEJOSO FERNÁNDEZ**

**Madrid, 2013**



**Dra. Irene Iglesias Peinado**, Profesora Titular del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid

**Dr. Luis Andrés López Fernández**, Jefe del Laboratorio de Farmacogenética y Farmacogenómica del Servicio de Farmacia del Hospital General Universitario Gregorio Marañón

#### CERTIFICAN

Que el presente trabajo titulado: “Biomarcadores farmacogenéticos asociados a efectos adversos de la quimioterapia frente al cáncer colorrectal” y llevado a cabo por la Licenciada en Farmacia **Dña. Lucía Cortejoso Fernández** ha sido realizado bajo nuestra dirección y asesoramiento.

Creemos que el mencionado trabajo reúne las características necesarias para ser defendido ante un tribunal para la obtención del grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, firmamos el presente certificado en Madrid a 4 de abril de 2013.



Profa. Dra. Dña. Irene Iglesias Peinado



Dr. D. Luis Andrés López Fernández



## AGRADECIMIENTOS

---

Me gustaría agradecer en primer lugar a mis directores de tesis Luis Andrés López Fernández e Irene Iglesias Peinado. Siempre estaré agradecida a Luis, quien ha sido un modelo de rigor científico en la investigación, además de la persona que me introdujo en el apasionante mundo de la farmacogenética; tampoco olvidaré su paciencia, tesón y confianza. Agradezco también la amable ayuda que me ha ofrecido Irene Iglesias. Debo dar además las gracias a María Isabel García, que igualmente ha tenido un papel muy destacado en este proyecto, por la alegría y el buen humor que contagia a los que trabajan a su lado; y a Eva González-Haba y Andrés Muñoz, por sus generosas propuestas para mejorar esta tesis.

También quiero agradecer a María Sanjurjo y Ana Herranz el haberme brindado la magnífica oportunidad de trabajar en este proyecto, y a todos mis compañeros y amigos del Servicio de Farmacia del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. A todos y cada uno de ellos quiero agradecerles sus enseñanzas, su ayuda y su amistad. Tuve la fortuna de rotar un mes en el *Knapp Center for Biomedical Discovery* de la Universidad de Chicago, donde mantuve valiosas conversaciones con la Minoli Perera, Keston Aquino-Michaelis y Peter O'Donnell; con ellos también tengo una gran deuda.

Mi reconocimiento se extiende además al Servicio de Oncología Médica, y en especial a Pilar García Alfonso, por su colaboración en el desarrollo de este proyecto; a José María Bellón, de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Gregorio Marañón, por su asistencia en el análisis estadístico; y, por supuesto, a todos los pacientes que participaron en el estudio.

Y en último lugar, aunque no menos importante, agradezco el apoyo incondicional y constante de mis padres, las correcciones estilísticas de mi hermano Miguel, y los buenos consejos de Thomas.

Mi más sincero agradecimiento a todos ellos.



# ÍNDICE DE CONTENIDOS

---

Índice de Contenidos.....	I
Índice de Figuras.....	VI
Índice de Tablas.....	VIII
Índice de Anexos.....	XII
Abreviaturas .....	XIII
<i>Abstract</i> .....	XV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Cáncer colorrectal .....	3
1.1.1. Aspectos generales .....	3
1.1.2. Tratamiento .....	7
1.1.2.1. Cirugía .....	7
1.1.2.2. Radioterapia .....	8
1.1.2.3. Quimioterapia.....	8
1.2. Farmacogenética.....	17
1.2.1. Aspectos generales .....	17
1.2.2. Principios básicos de la farmacogenética .....	19
1.2.3. Proyectos Genoma Humano y HapMap .....	21
1.2.4. Áreas de estudio de la farmacogenética .....	22
1.2.5. Diseño de estudios farmacogenéticos .....	24
1.3. Farmacogenética en cáncer colorrectal.....	26
1.3.1. Fluoropirimidinas .....	26
1.3.1.1. Dihidropirimidina deshidrogenasa .....	26
1.3.1.2. Timidilato sintasa.....	27
1.3.1.3. Metilentetrahidrofolato reductasa .....	28
1.3.1.4. Otros genes.....	28



1.3.2. Oxaliplatino .....	29
1.3.2.1. Glutación S-transferasas .....	29
1.3.2.2. Sistemas de reparación de ADN .....	30
1.3.2.3. Receptor del factor de crecimiento epidérmico.....	31
1.3.3. Irinotecan.....	31
1.3.3.1. Uridil glucuronosil transferasa 1A1 .....	31
1.3.3.2. <i>ATP-binding cassette</i> B1.....	32
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	35
2.1. Hipótesis.....	37
2.2. Objetivos.....	37
3. MATERIAL Y MÉTODO .....	39
3.1. Tipo de estudio .....	41
3.2. Población de estudio .....	41
3.3. Criterios de inclusión y de exclusión.....	41
3.4. Variables del estudio .....	42
3.4.1. Datos personales.....	42
3.4.2. Datos del tumor.....	43
3.4.3. Datos del tratamiento .....	43
3.4.4. Polimorfismos estudiados .....	43
3.4.5. Efectos adversos desarrollados y su gradación .....	44
3.5. Extracción de ADN .....	45
3.6. Análisis de genotipos .....	46
3.6.1. PCR y electroforesis.....	47
3.6.2. PCR y secuenciación .....	49
3.6.3. PCR, digestión y electroforesis .....	50
3.6.4. PCR a tiempo real con sondas TaqMan .....	52
3.6.5. SNaPshot .....	54

3.6.6. Número de copias.....	58
3.7. Análisis estadístico.....	59
3.8. Aspectos éticos .....	60
4. RESULTADOS.....	61
4.1. Características basales de los pacientes .....	63
4.2. Frecuencias genotípicas de polimorfismos potencialmente relevantes en farmacogenética del CCR .....	65
4.3. Revisión de la farmacogenética de las reacciones adversas al tratamiento quimioterápico en pacientes de CCR.....	69
4.4. Identificación de polimorfismos genéticos asociados a reacciones adversas al tratamiento con regímenes quimioterápicos que contienen 5-fluorouracilo en pacientes con CCR.....	70
4.4.1. Características basales de los pacientes.....	70
4.4.2. Polimorfismos analizados.....	71
4.4.3. Reacciones adversas moderadas-severas a 5-FU. Análisis estadístico... ..	71
4.4.4. Reacciones adversas severas a 5-FU. Análisis estadístico.....	77
4.5. Identificación de polimorfismos genéticos asociados a reacciones adversas al tratamiento con regímenes quimioterápicos que contienen capecitabina en pacientes con CCR .....	82
4.5.1. Características basales de los pacientes.....	82
4.5.2. Polimorfismos analizados.....	82
4.5.3. Reacciones adversas moderadas-severas a capecitabina. Análisis estadístico.....	83
4.5.4. Reacciones adversas severas a capecitabina. Análisis estadístico.....	94
4.6. Identificación de polimorfismos genéticos asociados a reacciones adversas al tratamiento con regímenes quimioterápicos que contienen oxaliplatino en pacientes con CCR .....	99
4.6.1. Características basales de los pacientes.....	99
4.6.2. Polimorfismos analizados.....	100
4.6.3. Reacciones adversas a oxaliplatino. Análisis estadístico .....	101

4.7. Identificación de polimorfismos genéticos asociados a reacciones adversas al tratamiento con regímenes quimioterápicos que contienen irinotecan en pacientes con CCR .....	105
4.7.1. Características basales de los pacientes .....	105
4.7.2. Polimorfismos analizados .....	106
4.7.3. Reacciones adversas a irinotecan. Análisis estadístico .....	106
4.8. Identificación de polimorfismos genéticos asociados a reacciones adversas al tratamiento en adyuvancia con FOLFOX o XELOX en pacientes con CCR .....	113
4.8.1. Características basales de los pacientes .....	113
4.8.2. Polimorfismos analizados .....	114
4.8.3. Reacciones adversas a FOLFOX/XELOX en adyuvancia. Análisis estadístico .....	115
5. DISCUSIÓN .....	121
5.1. Farmacogenética de reacciones adversas frente a fluoropirimidinas .....	128
5.1.1. Dihidropirimidina deshidrogenasa .....	129
5.1.2. Timidilato sintasa .....	131
5.1.3. Metilentetrahidrofolato reductasa .....	133
5.1.4. Citidina deaminasa .....	135
5.1.5. <i>ATP-binding cassette</i> B1 .....	136
5.1.6. <i>ATP-binding cassette</i> C4 y C5 .....	140
5.2. Farmacogenética de reacciones adversas frente a oxaliplatino .....	142
5.2.1. Glutatión S-transferasas .....	143
5.2.2. Sistemas de reparación de ADN por escisión de nucleótidos: <i>ERCC1</i> y <i>ERCC2</i> ...	144
5.2.3. Sistemas de reparación de ADN por escisión de bases: <i>XRCC1</i> .....	147
5.2.4. Receptor del factor de crecimiento epidérmico .....	147
5.3. Farmacogenética de reacciones adversas frente a irinotecan .....	149
5.3.1. Uridil glucuronosil transferasa 1A1 .....	149
5.3.2. Otros genes: <i>GSTT1</i> , <i>ERCC1</i> y <i>ERCC2</i> .....	152

6. CONCLUSIONES .....	157
7. BIBLIOGRAFÍA .....	161
8. ANEXOS .....	185

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1. Estimación de la incidencia y mortalidad de los principales tumores a nivel mundial y dividida por sexos.....	3
Figura 2. Incidencia de los cánceres más prevalentes en España en hombres y mujeres en los años 2006 y 2012 .....	4
Figura 3. Mortalidad de los cánceres más prevalentes en España en los años 2006 y 2012 ..	5
Figura 4. Representación de los diferentes estadios del CCR.....	7
Figura 5. Ruta metabólica de fluoropirimidinas .....	9
Figura 6. Mecanismo de acción de fluoropirimidinas.....	10
Figura 7. Ruta metabólica de oxaliplatino .....	11
Figura 8. Ruta metabólica de irinotecan.....	13
Figura 9. Estratificación de una población en función de la efectividad y toxicidad de un fármaco .....	17
Figura 10. Variaciones genéticas de importancia en farmacogenética .....	20
Figura 11. Principales enzimas implicadas en el metabolismo fase I y fase II de fármacos .	23
Figura 12. Representación del polimorfismo rs3918290 o IVS 14+1 en <i>DPYD</i> ( <i>DPYD*2A</i> ) .	27
Figura 13. Representación del polimorfismo rs8175347 en <i>UGT1A1</i> e implicación en la respuesta a irinotecan .....	32
Figura 14. Electroferogramas obtenidos para diferentes genotipos en <i>TYMS</i> 6del (del/WT, WT/WT y del/del), <i>EGFR</i> intrón 1 (CA) <sub>n</sub> (16/16, 18/20 y 18/21) y <i>UGT1A1</i> *28 (6/7, 6/6 y 7/7).....	49
Figura 15. Electroferograma de la reacción de secuenciación de <i>ERCC1</i> .....	50
Figura 16. Esquema representando el fragmento de PCR amplificado en <i>TYMS</i> que contiene el polimorfismo <i>TYMS</i> USF E-box .....	51
Figura 17. Gel de electroforesis mostrando los productos amplificados para <i>TYMS</i> USF E-box .....	52
Figura 18. Procedimiento de genotipado mediante sondas TaqMan .....	53
Figura 19. Gráfica de discriminación alélica con los diferentes genotipos para <i>DPYD*2A</i> utilizando sondas TaqMan.....	54
Figura 20. Electroferogramas de las reacciones de SNaPshot.....	57

Figura 21. Diagrama mostrando el número de copias de <i>GSTT1</i> .....	58
Figura 22. Reacciones adversas moderadas-severas (grado $\geq 2$ ) desarrolladas por los pacientes tratados con regímenes basados en 5-FU .....	72
Figura 23. Proporción de pacientes que desarrollaron diarrea moderada-severa (grado $\geq 2$ ) en función del genotipo de <i>ABCB1</i> C3435T y la presencia o no de irinotecan en el régimen.....	76
Figura 24. Reacciones adversas moderadas-severas (grado $\geq 2$ ) y severas (grado $\geq 3$ ) desarrolladas por los pacientes tratados con regímenes basados en 5-FU .....	78
Figura 25. Reacciones adversas moderadas-severas (grado $\geq 2$ ) desarrolladas por los pacientes tratados con regímenes basados en capecitabina .....	84
Figura 26. Proporción de pacientes que desarrollaron neutropenia moderada-severa (grado $\geq 2$ ) en función del genotipo de <i>ABCB1</i> C1236T y la presencia o no de irinotecan en el régimen .....	90
Figura 27. Porcentaje de pacientes que presentaron neutropenia, diarrea y síndrome mano-pie moderados-severos (grado $\geq 2$ ) en función del genotipo de <i>ABCB1</i> (C1236T o rs1128503, G2677T/A o rs2032583 y C3435T o rs1045642) y el tratamiento.....	91
Figura 28. Reacciones adversas moderadas-severas (grado $\geq 2$ ) y severas (grado $\geq 3$ ) desarrolladas por los pacientes tratados con regímenes basados en capecitabina .....	95
Figura 29. Reacciones adversas severas (grado $\geq 3$ ) desarrolladas por los pacientes tratados con regímenes basados en oxaliplatino.....	101
Figura 30. Reacciones adversas severas (grado $\geq 3$ ) desarrolladas por los pacientes tratados con regímenes basados en irinotecan.....	107
Figura 31. Reacciones adversas severas (grado $\geq 3$ ) desarrolladas por los pacientes tratados con los esquemas FOLFOX/XELOX en adyuvancia.....	115

## ÍNDICE DE TABLAS

---

Tabla 1. Clasificación y estadios TNM.....	6
Tabla 2. Reacciones adversas comunes a fármacos utilizados en CCR .....	15
Tabla 3. Polimorfismos/CNV seleccionados y fármacos con los que se relacionan .....	44
Tabla 4. Reacciones adversas estudiadas.....	45
Tabla 5. Variaciones genéticas analizadas, nomenclatura y técnicas utilizadas para su genotipado.....	46
Tabla 6. Secuencia de los oligonucleótidos diseñados para la PCR utilizada en el genotipado de los polimorfismos <i>TYMS</i> 6del, <i>EGFR</i> intrón 1 (CA) <sub>n</sub> y <i>UGT1A1</i> *28.....	48
Tabla 7. Condiciones de la PCR utilizada para el genotipado de los polimorfismos <i>TYMS</i> 6del, <i>EGFR</i> intrón 1 (CA) <sub>n</sub> , <i>UGT1A1</i> *28 y <i>ERCC1</i> Asn118Asn.....	48
Tabla 8. Condiciones de purificación por <i>ExoSapIt</i> .....	48
Tabla 9. Condiciones de la PCR utilizada para el genotipado del polimorfismo <i>TYMS</i> USF E-box .....	50
Tabla 10. Condiciones de la PCR inicial de la técnica SNaPshot.....	55
Tabla 11. Identificación de los polimorfismos estudiados y secuencia de los oligonucleótidos diseñados para la reacción SNaPshot.....	56
Tabla 12. Condiciones de la reacción de SNaPshot.....	57
Tabla 13. Características basales de los pacientes incluidos en el estudio .....	63
Tabla 14. Frecuencias genotípicas/alélicas para los polimorfismos analizados .....	66
Tabla 15. Estudio de desequilibrio de ligamiento entre polimorfismos .....	68
Tabla 16. Características basales de los pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en 5-FU .....	70
Tabla 17. Polimorfismos analizados en pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en 5-FU o capecitabina .....	71
Tabla 18. Valores de p para las asociaciones entre los polimorfismos estudiados y reacciones adversas moderadas-severas (grado $\geq 2$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos que contienen 5-FU.....	73
Tabla 19. Tablas de contingencia con las asociaciones estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre polimorfismos y reacciones adversas moderadas-severas (grado $\geq 2$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en 5-FU.....	74

Tabla 20. Tablas de contingencia con las asociaciones entre los polimorfismos analizados en <i>ABCB1</i> y diarrea moderada-severa (grado $\geq 2$ ) en la población tratada con 5-FU.....	75
Tabla 21. Tabla de contingencia con la asociación entre <i>ABCB1</i> C3435T y diarrea moderada-severa (grado $\geq 2$ ) en pacientes tratados con regímenes basados en 5-FU excluyendo combinaciones con irinotecan .....	75
Tabla 22. Regresión logística con las asociaciones que se mantuvieron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre polimorfismos y reacciones adversas moderadas-severas (grado $\geq 2$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en 5-FU .....	76
Tabla 23. Valores de p para las asociaciones entre los polimorfismos estudiados y reacciones adversas severas (grado $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos que contienen 5-FU.....	78
Tabla 24. Tablas de contingencia con las asociaciones estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre polimorfismos y reacciones adversas severas (grado $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en 5-FU .....	79
Tabla 25. Regresión logística con las asociaciones que se mantuvieron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre polimorfismos y reacciones adversas severas (grado $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en 5-FU.....	80
Tabla 26. Regresión logística incluyendo la presencia de oxaliplatino en el esquema basado en 5-FU y <i>TYMS</i> 6del como covariables en cuanto a la aparición de neuropatía moderada-severa (grado $\geq 2$ ) y severa (grado $\geq 3$ ).....	81
Tabla 27. Características basales de los pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina.....	83
Tabla 28. Comparación del perfil de toxicidad en la población de pacientes que recibieron regímenes basados en 5-FU y capecitabina en cuanto a las reacciones adversas moderadas-severas (grado $\geq 2$ ) más frecuentes.....	84
Tabla 29. Valores de p para las asociaciones entre los polimorfismos estudiados y reacciones adversas moderadas-severas (grado $\geq 2$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos que contienen capecitabina.....	86
Tabla 30. Tablas de contingencia con las asociaciones estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre polimorfismos y reacciones adversas moderadas-severas (grado $\geq 2$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina .....	87
Tabla 31. Tablas de contingencia con las asociaciones entre los polimorfismos analizados en <i>ABCB1</i> y neutropenia y síndrome mano-pie moderados-severos (grado $\geq 2$ ) en la población tratada con capecitabina.....	89



Tabla 32. Tabla de contingencia con la asociación entre <i>ABCB1</i> C1236T y neutropenia moderada-severa (grado $\geq 2$ ) en pacientes tratados con regímenes basados en capecitabina excluyendo combinaciones con irinotecan .....	89
Tabla 33. Regresión logística con las asociaciones que se mantuvieron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre polimorfismos y reacciones adversas moderadas-severas (grado $\geq 2$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina .....	92
Tabla 34. Regresión logística incluyendo la presencia de oxaliplatino en el esquema basado en capecitabina y <i>ABCC4</i> (A311G y T38G) como covariables en cuanto a la aparición de neuropatía moderada-severa (grado $\geq 2$ ) .....	93
Tabla 35. Tablas de contingencia con las asociaciones entre <i>ABCC4</i> (A311G y T38G) y neuropatía periférica moderada-severa (grado $\geq 2$ ) en pacientes tratados con regímenes basados en capecitabina excluyendo combinaciones con oxaliplatino .....	94
Tabla 36. Valores de p para las asociaciones entre los polimorfismos estudiados y reacciones adversas severas (grado $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos que contienen capecitabina .....	96
Tabla 37. Tablas de contingencia con las asociaciones estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre polimorfismos y reacciones adversas severas (grado $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina .....	97
Tabla 38. Regresión logística con las asociaciones que se mantuvieron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre polimorfismos y reacciones adversas severas (grado $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina...	97
Tabla 39. Características basales de los pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en oxaliplatino .....	99
Tabla 40. Polimorfismos/CNV analizados en pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en oxaliplatino o irinotecan .....	100
Tabla 41. Valores de p para las asociaciones entre los polimorfismos estudiados y reacciones adversas severas (grado $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos que contienen oxaliplatino .....	102
Tabla 42. Tablas de contingencia con las asociaciones estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre polimorfismos y reacciones adversas severas (grado $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en oxaliplatino.....	103
Tabla 43. Regresión logística con la asociación que se mantuvo estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre polimorfismos y reacciones adversas severas (grado $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en oxaliplatino ..	104

Tabla 44. Características basales de los pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en irinotecan.....	105
Tabla 45. Comparación de efectos adversos severos (grado $\geq 3$ ) en la población de pacientes que recibieron regímenes basados en oxaliplatino e irinotecan .....	107
Tabla 46. Valores de p para las asociaciones entre los polimorfismos estudiados y reacciones adversas severas (grado $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos que contienen irinotecan .....	109
Tabla 47. Tablas de contingencia con las asociaciones estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre variaciones genéticas y reacciones adversas severas (grado $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en irinotecan.....	110
Tabla 48. Tabla de contingencia con la asociación entre <i>ABCB1</i> C3435T y diarrea severa (grado $\geq 3$ ) en pacientes tratados con regímenes basados en irinotecan excluyendo combinaciones con 5-FU .....	111
Tabla 49. Regresión logística con las asociaciones que se mantuvieron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre polimorfismos y reacciones adversas severas (grado $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en irinotecan.....	112
Tabla 50. Características basales de los pacientes tratados con FOLFOX/XELOX en adyuvancia.....	113
Tabla 51. Polimorfismos/CNV analizados en pacientes tratados con FOLFOX/XELOX en adyuvancia.....	114
Tabla 52. Valores de p para las asociaciones entre los polimorfismos estudiados y reacciones adversas severas (grado $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes FOLFOX/XELOX en adyuvancia.....	116
Tabla 53. Tablas de contingencia con las asociaciones estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) (o cercanas a la significación estadística) entre polimorfismos y reacciones adversas severas (grado $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con FOLFOX/XELOX en adyuvancia.....	117
Tabla 54. Regresión logística con las asociaciones que se mantuvieron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre polimorfismos y reacciones adversas severas (grado $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con FOLFOX/XELOX en adyuvancia .....	118

## ÍNDICE DE ANEXOS

---

Anexo 1. Documento de Información al Paciente .....	187
Anexo 2. Consentimiento Informado .....	190
Anexo 3. Artículo de revisión: <i>Pharmacogenetic markers of toxicity for chemotherapy in colorectal cancer patients</i> . <u>Cortejoso L</u> , López-Fernández LA. <i>Pharmacogenomics</i> . 2012 Jul;13(10):1173-91.....	191
Anexo 4. Artículo original: <i>ABCB1 gene polymorphisms are associated with adverse reactions in fluoropyrimidine-treated colorectal cancer patients</i> . González-Haba E, García MI, <u>Cortejoso L</u> , López-Lillo C, Barrueco N, García-Alfonso P, et al. <i>Pharmacogenomics</i> . 2010 Dec;11(12):1715-23.....	210
Anexo 5. Artículo original: <i>Differential toxicity biomarkers for irinotecan- and oxaliplatin-containing chemotherapy in colorectal cancer</i> . <u>Cortejoso L</u> , García MI, García-Alfonso P, González-Haba E, Escolar F, Sanjurjo M, López-Fernández LA. <i>Cancer Chemotherapy and Pharmacology</i> (en edición) .....	219
Anexo 6. Producción científica: Artículos publicados y comunicaciones a congresos nacionales e internacionales.....	229

## ABREVIATURAS

---

ABC: *ATP-binding cassette*

ABCB1: *ATP-binding cassette B1*

ABCC4: *ATP-binding cassette C4*

ABCC5: *ATP-binding cassette C5*

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ARN mensajero

CCR: cáncer colorrectal

CDA: citidina deaminasa

CNV: variación del número de copias

cols.: colaboradores

CTCAE: *Common Terminology Criteria for Adverse Events*

dbSNP: *Single Nucleotide Polymorphism database*

DPYD: dihidropirimidina deshidrogenasa

ECOG: *Eastern Cooperative Oncology Group*

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico

EMA: Agencia Europea del Medicamento

ERCC: *excision repair cross complementation*

ERCC1: *excision repair cross complementation 1*

ERCC2: *excision repair cross complementation 2*

FDA: *Food and Drug Administration*

5-FU: 5-fluorouracilo

FOLFIRI: 5-Fluorouracilo + leucovorín + irinotecan

FOLFOX: 5-Fluorouracilo + leucovorín + oxaliplatino

GST: glutatión S-transferasa

GSTP1: glutatión S-transferasa pi 1

GSTT1: glutatión S-transferasa theta 1

GWAS: estudios de asociación de genoma completo

HGUGM: Hospital General Universitario Gregorio Marañón

IC: intervalo de confianza

LD: desequilibrio de ligamiento

LV: leucovorín

MTHFR: metilentetrahidrofolato reductasa

OR: *odds ratio*

pb: pares de bases

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PS: *performance status*

RCA: reacción cutánea acneiforme

rs: *reference SNP*

SMP: síndrome mano-pie

SNP: *single nucleotide polymorphism*

TOP1: topoisomerasa I

TYMS: timidilato sintasa

UGT: uridil glucuronosil transferasa

UGT1A1: uridil glucuronosil transferasa 1A1

UGT1A7: uridil glucuronosil transferasa 1A7

UGT1A9: uridil glucuronosil transferasa 1A9

USF: *upstream stimulating factor*

UTR: *untranslated region*

VNTR: variación en el número de repeticiones en tándem

vs.: versus

WT: *wild type*

XELIRI: Capecitabina + leucovorín + irinotecan

XELOX: Capecitabina + leucovorín + oxaliplatino

XRCC1: *X-ray cross complementation 1*

## ABSTRACT

---

**Introduction.-** 5-Fluorouracil (5-FU) and capecitabine, usually in combination with oxaliplatin or irinotecan, remain the *gold standards* in colorectal cancer (CRC) treatment. The recent addition of biological therapies, such as bevacizumab, cetuximab or panitumumab, has recently improved treatment outcome. However, the toxicity produced by all these drugs is a critical issue in CRC treatment. Access to molecular markers that could permit the identification of patients susceptible to the associated toxicity would be of enormous utility for oncologists. Currently, several genetic markers are known, but their prediction capability is still limited. The main objective of this study was to identify genetic variants associated with adverse reactions to 5-FU, capecitabine, oxaliplatin and irinotecan-containing regimens, and also to adjuvant FOLFOX/XELOX in CRC patients.

**Materials and methods.-** Prospective-retrospective study with 137 adult CRC patients recruited from the Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, and treated with 5-FU, capecitabine, oxaliplatin or irinotecan-containing regimens. The study was approved by the Regional Ethics Committee for Clinical Research and all patients signed an informed consent for the pharmacogenetic study. Twenty-one DNA variants in 14 genes related to the pharmacokinetics/dynamics of the drugs involved in the study were selected and genotyped by different techniques. Based on the *Common Terminology Criteria for Adverse Events* (CTCAE) v.3.0 patients were classified in two groups depending on the degree of toxicity developed. Linear by linear association  $\chi^2$  test (SPSS v.15.0) was used to study associations between genetic variations and toxicity, and a multivariate analysis including sex and performance status was also conducted.  $p < 0.05$  was considered significant.

**Results.-** A variety of associations between genetic variations and adverse reactions to the most frequent drugs used in CRC were identified and are discussed. The literature concerning pharmacogenetic biomarkers predictive of toxicity in CRC was thoroughly reviewed. Most significantly, patients homozygous for the variant alleles 1236T, 2677T/A and 3435T in *ABCB1* were found to develop lower rates of neutropenia and hand-foot syndrome with capecitabine-containing regimens compared to homozygous for the wild-type allele; however, patients homozygous for this wild-type allele developed lower rates of diarrhea with 5-FU-based regimens. The variant allele 751Gln in *ERCC2* was associated with a lower probability to develop severe nausea and vomiting to oxaliplatin-containing regimens and patients homozygous for the wild-type allele developed lower rates of diarrhea while treated with irinotecan.

**Conclusions.-** The polymorphisms C1236T, G2677T/A and C3435T in *ABCB1* could be biomarkers for predicting differential toxicity to 5-FU and capecitabine; similarly, *ERCC2* Lys751Gln could help to select an oxaliplatin or irinotecan-based regimen. Bigger cohorts are needed to verify the role of these polymorphisms to predict toxicity prior clinical application. If confirmed, these results could help oncologists reduce adverse reactions associated to chemotherapy in CRC patients by giving them their best therapeutic option, thus improving their quality of life.



## **1.- INTRODUCCIÓN**





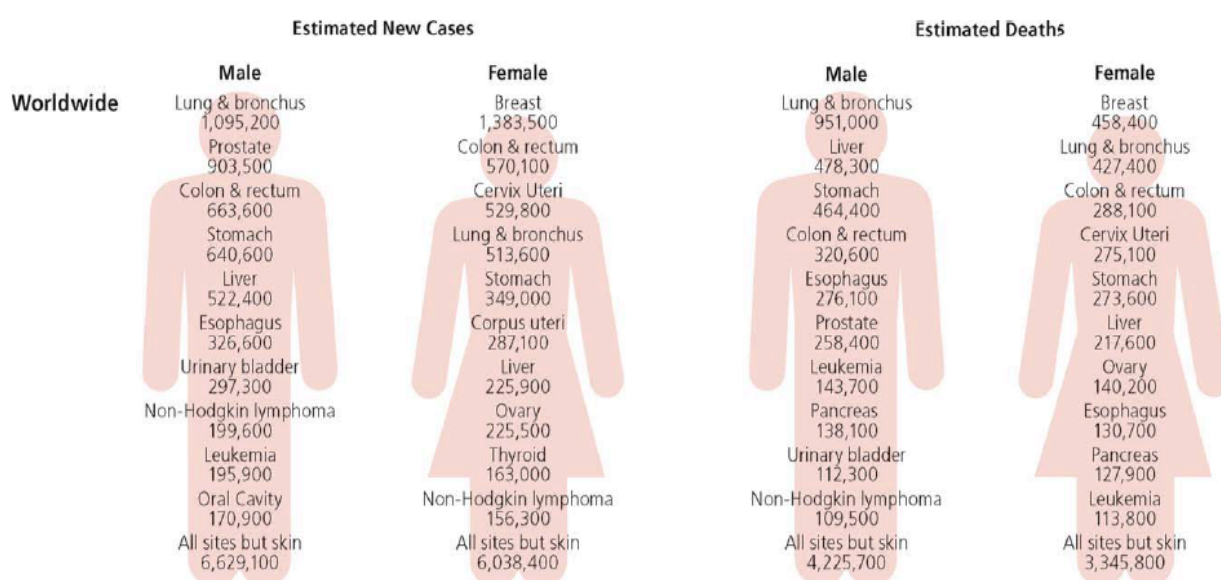
## 1.1.- Cáncer colorrectal

### 1.1.1.- Aspectos generales

Entendemos por cáncer colorrectal (CCR) la formación maligna que se inicia en la mucosa del recto o del colon y cuya histología típica corresponde a un adenocarcinoma (cáncer que empieza en las células que producen y liberan moco y otros líquidos). Hoy en día se acepta que el CCR se origina a causa de una acumulación de errores genéticos, presentes como defectos hereditarios o bien, de forma secundaria, resultado de determinados factores ambientales. El modelo aceptado de oncogénesis propugna que los cambios genéticos de la mucosa colorrectal dan lugar a que la mucosa normal pase a hiperplasia, adenoma, cáncer *in situ* y finalmente a un cáncer invasivo.

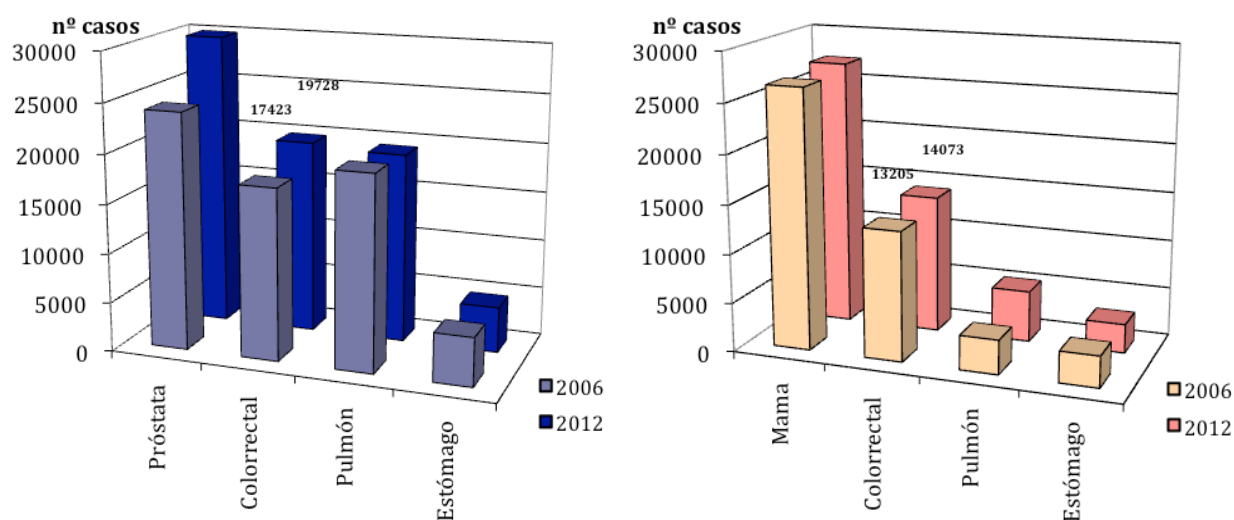
El CCR es el segundo cáncer más común entre las mujeres, después del cáncer de mama, y el tercero entre los hombres, después del cáncer de pulmón y el cáncer de próstata (Figura 1). En 2008 supuso más de 1,2 millones de nuevos casos y 608.700 muertes<sup>1</sup>.

Figura 1. Estimación de la incidencia y mortalidad de los principales tumores a nivel mundial y dividida por sexos<sup>1</sup>.



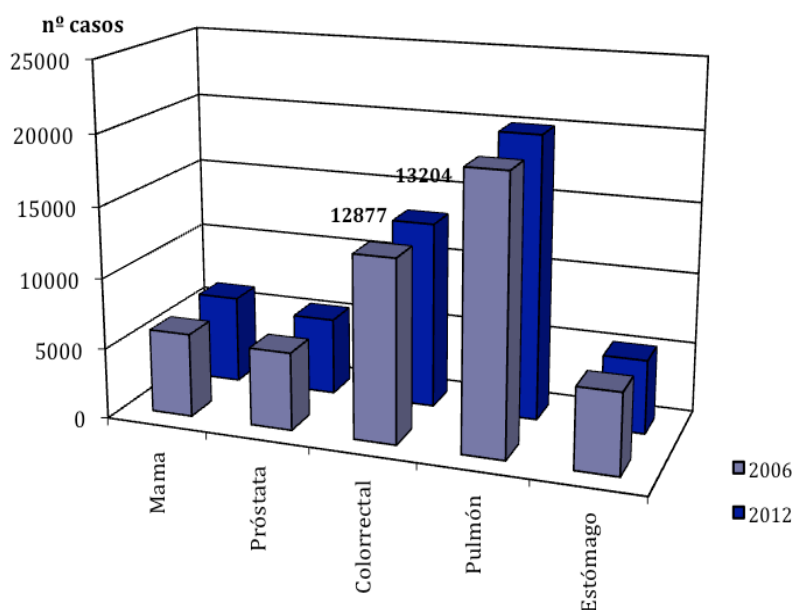
La incidencia del CCR está aumentando en áreas consideradas históricamente de bajo riesgo, como España y algunos países del este de Europa y Asia<sup>2,3</sup>. Esta tendencia se debe a una combinación de diferentes factores, entre los que se encuentran los cambios en los hábitos de alimentación, la obesidad y el incremento del consumo de tabaco<sup>2-5</sup>. Según datos de la Sociedad Española de Oncología Médica, en nuestro país la incidencia del CCR ha aumentado un 13,2% en hombres y un 6,6% en mujeres entre los años 2006 y 2012<sup>6</sup>, como puede verse en la Figura 2. Por su parte, un reciente estudio de la Sociedad Española de Patología Digestiva prevé que en el 2015 habrá unos 32.000 nuevos casos de CCR en España<sup>7</sup>. Este estudio revela además que en hombres la prevalencia pasaría de los 237,2 casos por 100.000 habitantes en el 2007 a los 273,7 en el 2022; la tasa de incidencia aumentaría de 48,2 a 55,2 casos; y la mortalidad de 22,7 a 26 casos. Sin embargo, se espera que las cifras relativas a las mujeres disminuyan, aunque no de forma acusada.

Figura 2. Incidencia de los cánceres más prevalentes en España en hombres (izquierda) y mujeres (derecha) en los años 2006 y 2012<sup>6</sup>.



El CCR constituye la segunda causa de muerte por cáncer en España, después del cáncer de pulmón (Figura 3), aunque su incidencia y mortalidad son menores que la media de la Unión Europea. En países occidentales, las tasas de mortalidad están disminuyendo<sup>3</sup> gracias a la detección cada vez más temprana de estos tumores y a las mejoras en los tratamientos disponibles<sup>8-11</sup>.

Figura 3. Mortalidad de los cánceres más prevalentes en España en los años 2006 y 2012<sup>6</sup>.



El CCR suele diagnosticarse a partir de los 60 años, con un incremento exponencial de su incidencia con relación a la edad. Sin embargo, algunas formas hereditarias de esta enfermedad, como son la poliposis adenomatosa familiar o el CCR hereditario no poliposo o síndrome de Lynch, se detectan antes de los 50 años<sup>12</sup>.

Los factores de riesgo modificables de CCR incluyen el tabaco, la falta de ejercicio físico, el sobrepeso y la obesidad, el consumo de carnes rojas y procesadas, y el abuso de alcohol<sup>13-16</sup>. Otros factores de riesgo son la diabetes<sup>12</sup>, la sepsis por *Streptococcus bovis*<sup>17</sup> y la enfermedad inflamatoria intestinal<sup>18,19</sup>. Por el contrario, dietas con un alto contenido en fibra dietética, calcio y vitamina D se asocian con un riesgo reducido de CCR<sup>20-22</sup>. Finalmente, algunos fármacos han demostrado evitar la aparición de lesiones premalignas y su transformación en cáncer, como los antiinflamatorios no esteroideos, las estatinas o la suplementación hormonal en mujeres posmenopáusicas<sup>23</sup>.

La sintomatología del CCR suele aparecer ya en fases avanzadas de la enfermedad, cuando las posibilidades de curación son menores. Es, por tanto, fundamental tener en cuenta los principales síntomas de alarma (dolor abdominal, cambio en el hábito intestinal y sangrado), que hacen sospechar la presencia de un proceso tumoral. Tras la realización de la historia clínica, es necesario realizar una exploración física completa y pruebas

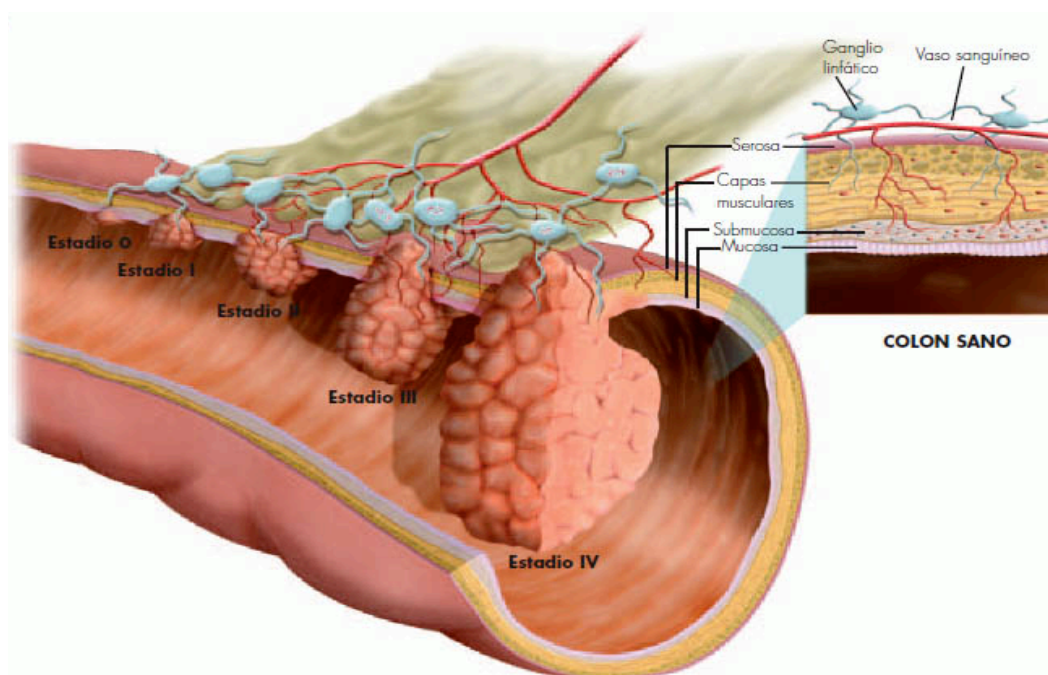
complementarias encaminadas al diagnóstico para poder establecer la mejor opción terapéutica. El CCR es diagnosticado por los resultados de la colonoscopia o sigmoidoscopia con biopsia tumoral; y también es necesario realizar una tomografía axial computarizada del tórax, abdomen y pelvis para identificar una posible enfermedad metastásica<sup>12,24</sup>.

La estadificación patológica constituye el factor pronóstico más importante en pacientes de CCR y es fundamental para establecer el tratamiento más adecuado. Existen diferentes clasificaciones para la estadificación del CCR. Hasta hace unos años la más utilizada era la de Dukes, con su posterior modificación realizada por Astler y Coler; pero hoy en día la más usada es la del TNM, definida por el *American Joint Committee on Cancer* y la Unión Internacional Contra el Cáncer<sup>25</sup>, que distingue la infiltración a través de la pared definida por la T, la afectación ganglionar definida por la N, y la presencia o ausencia de metástasis a distancia determinada por la M (Tabla 1 y Figura 4).

Tabla 1. Clasificación y estadios TNM. Adaptado del *American Joint Committee on Cancer*<sup>25</sup>.

Clasificación TNM			
T			
Tis cáncer <i>in situ</i>			
T1 invade submucosa			
T2 invade muscular propia			
T3 invade la subserosa o grasa perirrectal			
T4 invade serosa o estructuras vecinas			
N			
N0 no adenopatías afectas			
N1 de 1 a 3 adenopatías afectas			
N2 4 o más adenopatías afectas			
N3 adenopatías afectas en el curso de los vasos principales			
M			
M0 ausencia de metástasis			
M1 metástasis a distancia			
Estadios			
0	Tis	N0	M0
I	T1, 2	N0	M0
II	T3, 4	N0	M0
III	T cualquiera	N1, 2, 3	M0
IV	T cualquiera	N cualquiera	M1

Figura 4. Representación de los diferentes estadios del CCR. © DAE, SL.<sup>26</sup>.



## 1.1.2.-Tratamiento

### 1.1.2.1.- Cirugía

En el caso de los tumores localizados, la cirugía ofrece una posibilidad curativa. El objetivo en la cirugía de colon es realizar una resección total del tumor, con amplios márgenes de seguridad, así como de los ganglios linfáticos afectados<sup>12</sup>. Para la resección de los cánceres rectales, la escisión mesorrectal total, junto con linfadenectomía de ganglios mesentéricos inferiores, constituye la técnica de elección. La adición de quimioterapia antes y después de la cirugía reduce el riesgo de recaída después de la misma<sup>27</sup>.

Por otra parte, la resección de las metástasis hepáticas y pulmonares es el tratamiento estándar de la enfermedad oligometastásica potencialmente resecable y se ha visto que mejora sustancialmente la supervivencia<sup>12</sup>.

### 1.1.2.2.- Radioterapia

La radioterapia consiste en el uso de rayos de alta energía, por ejemplo los rayos X, para eliminar o reducir el tamaño de los tumores. Se puede emplear tanto radiación externa (procedente de una fuente exterior al organismo), como interna (procedente de un implante radiactivo colocado en el tumor).

Por medio de la radioterapia postoperatoria se pretende destruir pequeñas áreas del cáncer que hayan podido pasar desapercibidas durante la cirugía. Hoy en día se sabe que la quimio-radioterapia preoperatoria logra una mayor tasa de respuestas locales en comparación con la radioterapia preoperatoria<sup>28,29</sup>; también se asocia a una menor toxicidad que la quimio-radioterapia postoperatoria<sup>30</sup>. La radioterapia resulta útil además como tratamiento paliativo en la enfermedad avanzada, para aliviar síntomas como la obstrucción intestinal, el sangrado o el dolor.

### 1.1.2.3.- Quimioterapia

En la última década, el tratamiento quimioterápico del CCR ha evolucionado mucho mediante la administración de fármacos como fluoropirimidinas [5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina y tegafur], oxaliplatino e irinotecan, y anticuerpos monoclonales (cetuximab, panitumumab y bevacizumab). La combinación de estos fármacos ha mejorado el pronóstico de la enfermedad, pero a la vez ha aumentado los efectos adversos asociados a la misma. Además, hay pacientes que no se benefician de la terapia y están expuestos a los efectos adversos asociados<sup>31</sup>.

#### *5-Fluorouracilo*

El 5-FU es una fluoropirimidina perteneciente al grupo de los antimetabolitos y ha sido, desde su aparición en 1957, el fármaco más utilizado en CCR. Precisa metabolización hepática para convertirse en una molécula activa y su catabolismo está mediado por la dihidropirimidina deshidrogenasa (DPYD) (Figura 5). Su vida media es de unos 15 min, alcanza buena distribución por todo el organismo y presenta una escasa absorción a nivel

The diagram illustrates the pharmacokinetics of 5-fluorouracil (5-FU) within a liver cell, showing its conversion to various metabolites and its role in the PD pathway.

**Apical membrane:**

- Transporters:** SLC22A7, ABCG2, and ABCC4 are involved in the transport of 5-FU and its metabolites across the apical membrane.
- Metabolism:**
  - Capecitabine** is converted to **5'dFCR** by **CES1** and **CES2**, then to **5'dFUR** by **CDA**.
  - 5'dFUR** is converted to **5-FU** by **UPP1** and **UPP2**.
  - 5-FU** is converted to **DHFU** by **DPYD**.
  - DHFU** is converted to **FUPA** by **DPYS**.
  - FUPA** is converted to **FBAL** by **UPB1**.
  - 5-FU** is converted to **FUR** by **UPP1** and **UPP2**.
  - FUR** is converted to **FUMP** by **UCK1** and **UCK2**.
  - FUMP** is converted to **FUDP** by **RRM1** and **RRM2**.
  - FUDP** is converted to **FUTP** by **ABCC3** and **ABCC4**.

**Basolateral membrane:**

- Transporters:** ABCC3, ABCC4, and ABCC5 are involved in the transport of 5-FU and its metabolites across the basolateral membrane.
- Reuptake:** SLC29A1 is involved in the reuptake of 5-FU into the cell.
- Efflux/Drug resistance:** ABCC3, ABCC4, and ABCC5 are involved in the efflux of 5-FU and its metabolites, leading to drug resistance.

**PD pathway:**

- 5-FU** is converted to **FdUMP** by **TYMP**.
- FdUMP** is converted to **FdUDP** by **TK1**.
- FdUDP** is converted to **FdUTP** by **TYMS**.
- FdUTP** is converted to **FUTP** by **ABCC3** and **ABCC4**.
- FUTP** is converted to **FUTP** by **ABCC3** and **ABCC4**.
- FUTP** is converted to **FUTP** by **ABCC3** and **ABCC4**.

**Other components:**

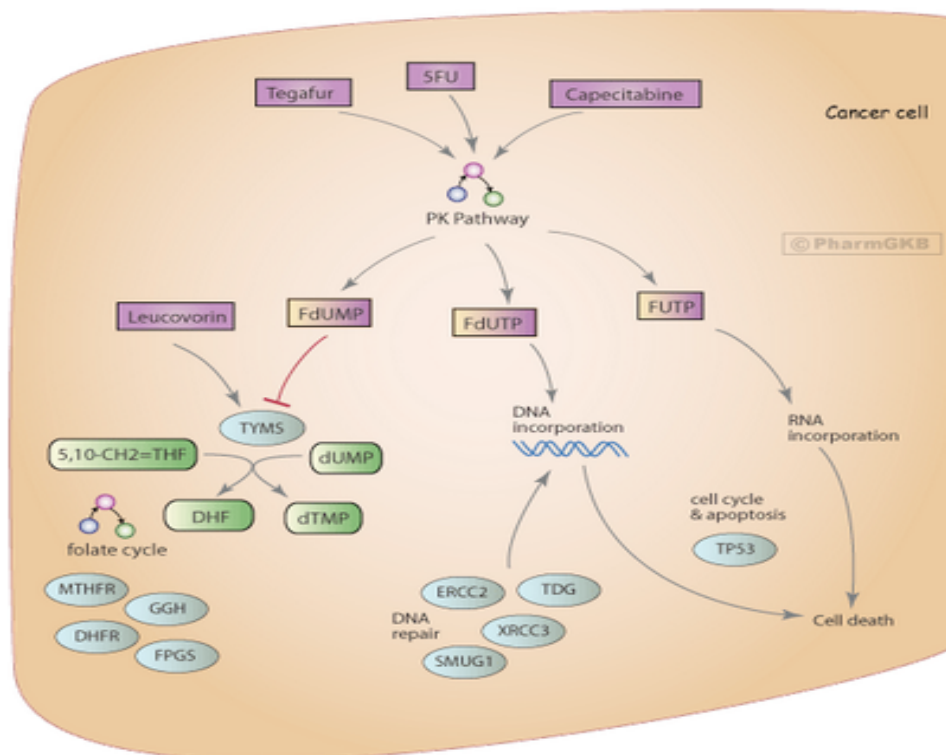
- Tegafur** is converted to **5'hydroxytegafur** by **CYP2A6**.
- 5'hydroxytegafur** is converted to **5-FU** by **TYMP**.
- 5-FU** is converted to **FUDR** by **TYMP**.
- FUDR** is converted to **FdUMP** by **TK1**.
- FdUMP** is converted to **FdUDP** by **TK1**.
- FdUDP** is converted to **FdUTP** by **TYMS**.
- FdUTP** is converted to **FUTP** by **ABCC3** and **ABCC4**.
- FUTP** is converted to **FUTP** by **ABCC3** and **ABCC4**.
- FUTP** is converted to **FUTP** by **ABCC3** and **ABCC4**.

**Legend:**

- 5-FU** (purple box)
- 5'dFUR** (purple box)
- DHFU** (orange box)
- FUPA** (orange box)
- FBAL** (orange box)
- FUR** (purple box)
- FUMP** (purple box)
- FUDP** (purple box)
- FUTP** (purple box)
- FdUMP** (purple box)
- FdUDP** (purple box)
- FdUTP** (purple box)
- Capecitabine** (purple box)
- 5'dFCR** (purple box)
- 5'hydroxytegafur** (purple box)
- Tegafur** (purple box)
- FUDR** (purple box)
- UPP1** (blue oval)
- UPP2** (blue oval)
- DPYD** (blue oval)
- DPYS** (blue oval)
- UCK1** (blue oval)
- UCK2** (blue oval)
- RRM1** (blue oval)
- RRM2** (blue oval)
- ABCC3** (blue oval)
- ABCC4** (blue oval)
- ABCC5** (blue oval)
- SLC29A1** (blue oval)
- SLC22A7** (blue oval)
- ABCG2** (blue oval)
- ABCC4** (blue oval)
- CES1** (blue oval)
- CES2** (blue oval)
- CDA** (blue oval)
- UPB1** (blue oval)
- TYMP** (blue oval)
- CYP2A6** (blue oval)
- TK1** (blue oval)
- TYMS** (blue oval)

**© PharmGKB**



Figura 6. Mecanismo de acción de fluoropirimidinas. Fuente: PharmGKB<sup>35</sup>.

El 5-FU en combinación con LV alcanzó una tasa de respuesta del 20-30% con una media de supervivencia de 12 meses<sup>36,37</sup>. Posteriormente, mediante la combinación de 5-FU/LV con oxaliplatino e irinotecan, se mejoró la respuesta a un 53 y 49%, respectivamente y se prolongó la supervivencia global a 19 y 17 meses, respectivamente<sup>38,39</sup>. De esta manera, regímenes que contienen 5-FU, LV y oxaliplatino (FOLFOX) o irinotecan (FOLFIRI), y capecitabina y oxaliplatino (XELOX) o irinotecan (XELIRI) son los más frecuentes en primera línea en el tratamiento de CCR metastásico<sup>40</sup>.

### Capecitabina

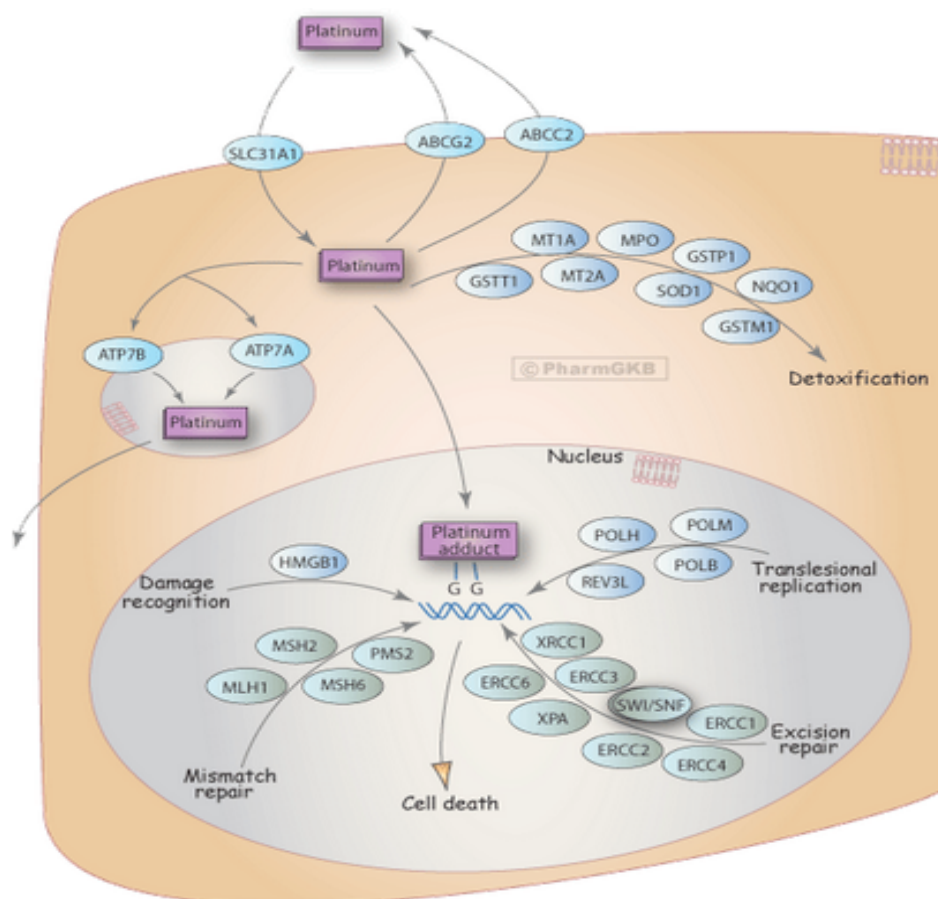
Como alternativa a la administración intravenosa de 5-FU, y debido a su baja disponibilidad por vía oral, se desarrolló la capecitabina, un profármaco que, tras una triple conversión enzimática, se transforma en 5-FU (Figura 5). La última de estas reacciones es catalizada por la timidilato fosforilasa (TYMP), enzima presente en una mayor concentración en el tumor en comparación con otros tejidos<sup>41,42</sup>.

La capecitabina ha demostrado tener una eficacia parecida a 5-FU, tanto en adyuvancia como en enfermedad metastásica<sup>43,44</sup>.

### *Oxaliplatino*

El oxaliplatino es un derivado de platino de tercera generación. Los agentes derivados del platino producen enlaces intrahebra o entre las dos hebras del ADN, conocidos como aductos, que resultan en la formación de uniones covalentes entre el complejo activo platinado y determinadas bases de la secuencia del ADN, lo que lleva, en último término, a la apoptosis<sup>45</sup> (Figura 7).

Figura 7. Ruta metabólica de oxaliplatino. Fuente: PharmGKB<sup>35</sup>.

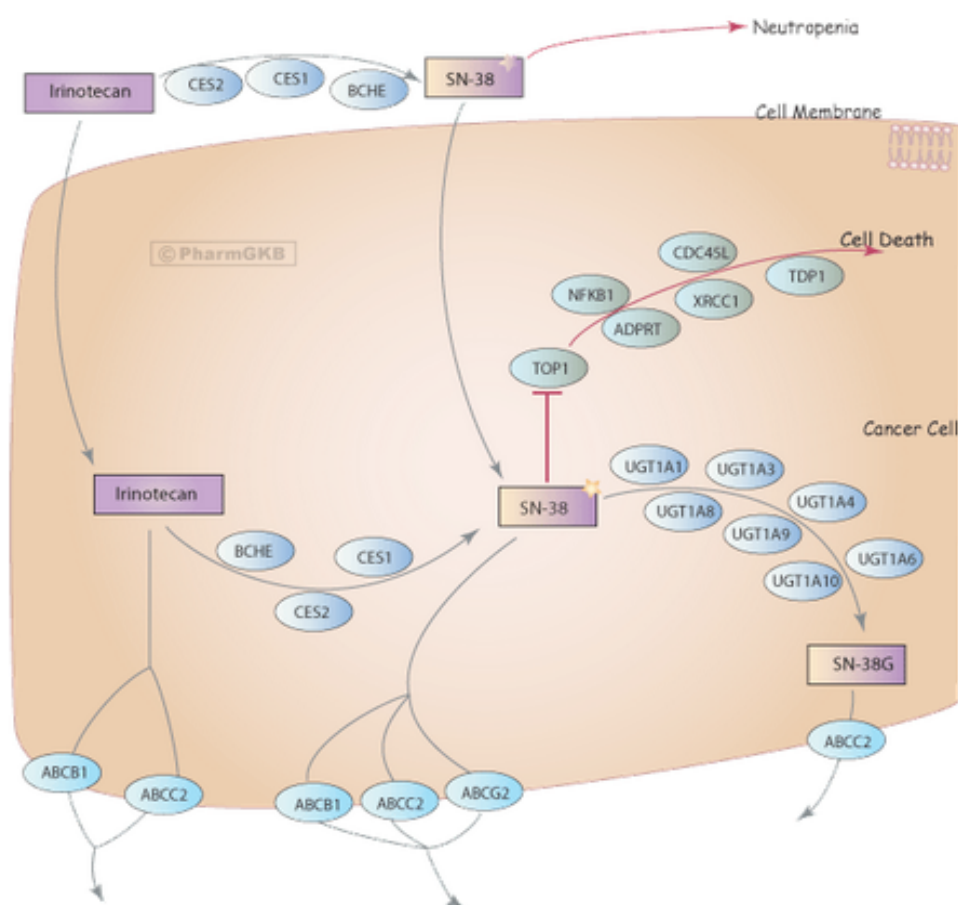


En el estudio *MOSAIC*, que comparaba el tratamiento con oxaliplatino combinado con 5-FU/LV versus (vs.) 5-FU/LV, la adición de oxaliplatino mejoró la supervivencia libre de enfermedad a 5 años en un 6%, dando lugar a una ganancia de un 2,5% en supervivencia global a los 6 años para estadios II y III, y de un 4,2% en estadio III<sup>46</sup>. En cuanto a la combinación con capecitabina, en el estudio *XELOXA*, que comparaba capecitabina oral combinada con oxaliplatino vs. 5-FU/LV en estadio III, hubo también mejora en la supervivencia libre de enfermedad a 3 años, pero no en la supervivencia global a 5 años<sup>47</sup>. La adición de oxaliplatino a 5-FU o capecitabina es también una práctica habitual en primera línea de CCR metastático<sup>48</sup>. Además, la evidencia disponible sugiere que los tratamientos basados en oxaliplatino son los más adecuados para el tratamiento neoadyuvante del CCR<sup>27</sup>.

### *Irinotecan*

El irinotecan es un agente antineoplásico derivado semisintético de la camptotecina. Es metabolizado en la mayoría de los tejidos por la carboxilesterasa a SN-38 (Figura 8), el cual se ha revelado más activo que el irinotecan en la inhibición de la topoisomerasa I (TOP1). Esta inhibición provoca fallos en la transcripción, con la consiguiente fragmentación del ADN e inhibición de la proliferación<sup>49</sup>.

La adición de irinotecan a 5-FU en terapia adyuvante no mejora la supervivencia libre de enfermedad ni la supervivencia global<sup>50,51</sup>, aunque hubo una mejoría no significativa para el tratamiento combinado en el ensayo *PETACC-3*<sup>52</sup>. Al igual que oxaliplatino, irinotecan combinado con 5-FU o capecitabina es un esquema habitual en CCR metastático<sup>53</sup>.

Figura 8. Ruta metabólica de irinotecan. Fuente: PharmGKB<sup>35</sup>.

### Otros fármacos

En la enfermedad metastásica, medicamentos más recientes como el **cetuximab** y el **panitumumab**, anticuerpos monoclonales dirigidos contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), o el **bevacizumab**, un anticuerpo inhibidor del factor de crecimiento vascular endotelial, han logrado aumentar la supervivencia media de estos pacientes<sup>54,55</sup>.

El cetuximab ha demostrado ser eficaz en la reversión de la resistencia a irinotecan<sup>54,56</sup>, y también ha demostrado eficacia en pacientes no tratados en combinación con 5-FU e irinotecan/oxaliplatino<sup>57-59</sup>. Al estratificar a los pacientes en función del estado de KRAS (nativo frente a mutado), las diferencias en cuanto a supervivencia libre de progresión y supervivencia global fueron mucho más evidentes en el caso de pacientes con KRAS nativo<sup>60</sup>. También se ha demostrado el efecto del estado de KRAS en la eficacia del

panitumumab<sup>61</sup>, que se explica porque este fármaco comparte el mismo mecanismo de acción que el cetuximab.

El bevacizumab en combinación con 5-FU e irinotecan en CCR metastásico ha demostrado incrementar la tasa de respuestas y la supervivencia global<sup>55</sup>. La adición de bevacizumab a la terapia basada en oxaliplatino mejoró la supervivencia en pacientes pretratados<sup>62</sup>. Por último, se está investigando la terapia de mantenimiento con bevacizumab en monoterapia tras respuesta inicial al tratamiento, pero se sabe que el bevacizumab tiene baja actividad por sí mismo<sup>62</sup>.

### *Toxicidad de la quimioterapia*

La mayoría de pacientes de CCR experimenta toxicidad moderada en algún momento a lo largo del tratamiento; sin embargo, una minoría significativa experimenta toxicidad severa, que puede dar lugar a retrasos o reducciones de dosis en alguno de los ciclos, afectando de esta manera la eficacia de la quimioterapia. En casos puntuales, la toxicidad puede llegar a ser fatal<sup>31</sup>.

Se ha descrito que la variabilidad genética tiene también un papel importante en la toxicidad a fármacos quimioterápicos<sup>63</sup>, además de otros factores como la edad, el *performance status* (PS), la disfunción de órganos y la presencia de otras comorbilidades.

La Tabla 2 resume las reacciones adversas más frecuentemente asociadas al tratamiento con 5-FU, capecitabina, oxaliplatino e irinotecan. La toxicidad hematológica (leucopenia, neutropenia y trombocitopenia) y gastrointestinal (diarrea y mucositis) es común a todos los fármacos descritos anteriormente. Sin embargo, hay también reacciones adversas dependientes de fármaco, como el síndrome mano-pie (SMP) inducido por capecitabina, o la neuropatía sensorial inducida por oxaliplatino.

Tabla 2. Reacciones adversas comunes a fármacos utilizados en CCR<sup>64</sup>.

<b>5-FU</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mielosupresión, neutropenia, trombocitopenia, leucopenia, agranulocitosis, anemia y pancitopenia</li> <li>- Mucositis, anorexia, diarrea, náuseas y vómitos</li> <li>- Alopecia</li> <li>- Retraso en la cicatrización, epistaxis y fatiga</li> <li>- Hiperuricemia</li> <li>- Broncoespasmo</li> <li>- Cambios en el electrocardiograma</li> <li>- Inmunosupresión</li> </ul>
<b>Capecitabina</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Síndrome mano-pie</li> <li>- Diarrea, náuseas y vómitos, estomatitis y dolor abdominal</li> <li>- Anorexia</li> <li>- Fatiga y astenia</li> </ul>
<b>Oxaliplatino</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Neuropatía periférica, trastornos sensoriales, disgeusia y dolor de cabeza</li> <li>- Reacción alérgica</li> <li>- Anemia, neutropenia, trombocitopenia, leucopenia y linfopenia (en combinación con 5-FU)</li> <li>- Náuseas y vómitos, diarrea, estomatitis/mucositis, dolor abdominal y estreñimiento</li> <li>- Trastornos cutáneos y alopecia</li> <li>- Fatiga, fiebre, astenia, dolor y reacción en el punto de inyección</li> <li>- Anorexia, deshidratación, edemas, hipokalemia</li> <li>- Disnea y tos</li> <li>- Dolor de espalda</li> <li>- Infección</li> <li>- Incremento de: enzimas hepáticas, fosfatasa alcalina, bilirrubina, lactato deshidrogenasa y peso (en combinación con 5-FU)</li> </ul>
<b>Irinotecan</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diarrea</li> <li>- Neutropenia y anemia</li> <li>- Náuseas y vómitos</li> <li>- Alopecia</li> </ul>

Un metaanálisis con 1.219 pacientes de CCR que recibieron 5-FU mostró que aproximadamente el 31-34% desarrolló toxicidad grado 3/4, y que el 0,5% de ellos desarrolló toxicidad letal<sup>34</sup>. La toxicidad al tratamiento con 5-FU depende de la dosis, el esquema administrado, la vía de administración y de la combinación o no con LV. En Estados Unidos, el esquema de administración de la *Clínica Mayo* ha sido el estándar de administración durante muchos años<sup>65</sup>; sin embargo, existen estudios que han demostrado que otros esquemas de administración conllevan la misma eficacia, pero se asocian a una menor toxicidad. Por ejemplo, el esquema *de Gramont* conlleva menores tasas de diarrea, mucositis y neutropenia que el esquema de la *Clínica Mayo*<sup>66</sup>, y menores tasas de

neutropenia grado 3/4 y alopecia grado 2 que el esquema *Nordic* con irinotecan<sup>67</sup>. Tal y como se ha comentado anteriormente, la administración en forma de infusión continua se asocia en general a menor toxicidad en comparación con la administración de 5-FU en bolo<sup>68,69</sup>.

Aunque capecitabina es un profármaco de 5-FU, existen diferencias significativas en cuanto a su perfil de toxicidad. Mientras que la toxicidad hematológica se asocia con más frecuencia a 5-FU, especialmente en el esquema de la *Clínica Mayo*, efectos adversos como diarrea, náuseas y vómitos, y SMP están más asociados al tratamiento con capecitabina<sup>70</sup>.

La toxicidad más importante de oxaliplatino es la neurológica, que se manifiesta en forma de disestesias y parestesias, es acumulativa y se exacerba con el frío. Según datos de la agencia reguladora de medicamentos en Estados Unidos, la FDA (del inglés *Food and Drug Administration*), más del 70% de los pacientes que reciben oxaliplatino desarrollan algún grado de neuropatía sensorial<sup>71</sup>, incluyendo ototoxicidad y síndrome disfónico<sup>72</sup>. Recientemente se ha visto que la persistencia de esta toxicidad neurológica tras la interrupción de regímenes FOLFOX puede llegar a ser de hasta un 80%<sup>73</sup>.

Una toxicidad severa, basada en el desarrollo de neutropenia y diarrea, puede ocurrir durante el tratamiento con irinotecan, especialmente en pacientes con síndrome de Gilbert<sup>74</sup>.

Las secuencias de tratamiento FOLFOX-FOLFIRI y FOLFIRI-FOLFOX demostraron eficacia similar frente a la enfermedad metastásica<sup>53</sup>, aunque en general se prefiere empezar por el esquema FOLFOX, ya que produce menos náuseas, diarrea y alopecia que FOLFIRI, pese a la neurotoxicidad dosis-dependiente a que da lugar<sup>33</sup>.

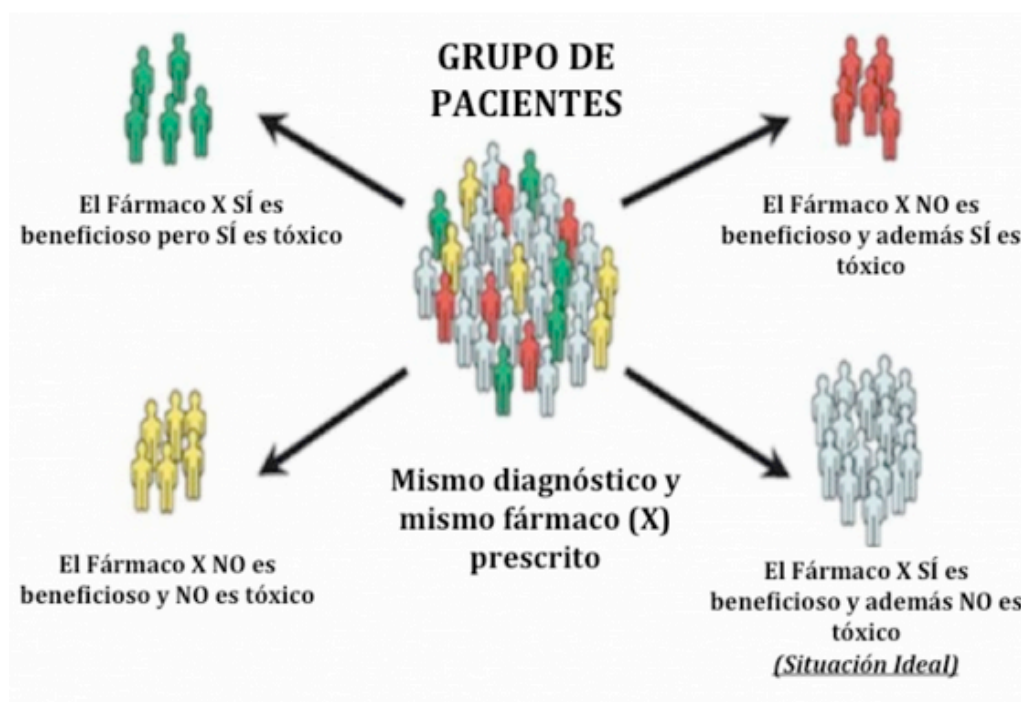
Con respecto a reacciones adversas a los anticuerpos monoclonales utilizados en CCR, la toxicidad más frecuente de cetuximab es el rash cutáneo, que suele asociarse a la respuesta al tratamiento, mientras que bevacizumab puede desencadenar hipertensión y proteinuria, y otros efectos adversos menos frecuentes pero de gran importancia como perforación intestinal, sangrado y eventos tromboembólicos<sup>75,76</sup>.

## 1.2.- Farmacogenética

### 1.2.1.- Aspectos generales

El tratamiento farmacológico hoy en día se basa en el método de ensayo y error, de modo que a un paciente se le prescribe normalmente el fármaco de primera elección indicado en la patología presente y, en función de la respuesta, se cambia o no por otro hasta dar con el medicamento más apropiado para ese paciente. Todo este proceso puede llevar bastante tiempo, aparte del trastorno que supone la falta de efectividad y/o la aparición de efectos adversos. La Figura 9 ilustra cómo un mismo fármaco, administrado a un grupo de pacientes con la misma enfermedad, da lugar a diferentes respuestas en cuanto a efectividad y toxicidad. Esta variabilidad se debe a la combinación de múltiples factores ambientales con la genética de los individuos. En este contexto, el objetivo de la farmacogenética es conseguir una medicina más individualizada, es decir, que un determinado paciente reciba el fármaco más eficaz con el menor riesgo de efectos adversos y a la dosis más adecuada.

Figura 9. Estratificación de una población en función de la efectividad y toxicidad de un fármaco.





Como nueva disciplina, la farmacogenética nació hacia los años 50, cuando las nuevas técnicas permitieron el análisis de la actividad enzimática, metabolitos y respuesta a fármacos. Fue Arno Motulsky el primero que documentó, en 1957, que las diferencias individuales en la respuesta a medicamentos podían explicarse por los defectos heredados en el metabolismo de fármacos<sup>77</sup>. Dos años más tarde, en 1959, Friedrich Vogel acuñó el término “farmacogenética” y lo definió como el “estudio del papel de la genética en la respuesta a fármacos”<sup>78</sup>.

Actualmente la farmacogenética se define como el estudio de la influencia que tienen las variaciones en la secuencia de ADN sobre la respuesta a los fármacos<sup>79</sup>. La farmacogenómica engloba un concepto más amplio y, aunque a veces “farmacogenética” y “farmacogenómica” se utilizan indistintamente, ésta última hace referencia a variaciones en la secuencia de ADN y ARN, y su relación con la respuesta a fármacos.

Una realidad constatada desde hace mucho tiempo es que no hay casi ningún fármaco que sea efectivo para todos los pacientes. Se calcula que la media de efectividad de los fármacos es aproximadamente un 60%<sup>80</sup>, lo que da lugar en muchas ocasiones a fracaso terapéutico, gastos innecesarios y, en definitiva, a una mala calidad en la asistencia sanitaria. El porcentaje de eficacia de los fármacos utilizados en oncología es menor incluso que el del conjunto de medicamentos, de apenas un 25%<sup>81</sup>. Otro aspecto absolutamente relevante es el de las reacciones adversas a medicamentos. Un estudio llevado a cabo en Estados Unidos revela que 2 millones de personas fueron ingresadas al año por reacciones adversas a la medicación; 100.000 de éstas murieron, convirtiéndose en la cuarta causa de muerte en este país<sup>82</sup>. A nivel nacional, el porcentaje de ingresos por reacciones adversas a medicamentos llega a un 4%<sup>83</sup>.

Iniciativas como *Pharmacogenomics Knowledgebase* (PharmGKB)<sup>35</sup> ponen a disposición del público información sobre polimorfismos, genes, medicamentos, enfermedades, guías clínicas, información de dosis en función del genotipo, entre otros aspectos, ayudando de esta manera a implementar la farmacogenética en la asistencia sanitaria<sup>84</sup>.

En este contexto, la aplicación de la farmacogenética en la práctica clínica habitual ayudaría a elegir la terapia más efectiva y a disminuir los riesgos de presentar efectos adversos

severos. Esto contribuiría a reducir el gasto farmacéutico, minimizando tratamientos inefectivos y el gasto hospitalario, evitando ingresos por reacciones adversas severas, que a su vez requieren nueva medicación.

### 1.2.2.- Principios básicos de la farmacogenética

Un gen es una secuencia ordenada de nucleótidos en la molécula de ADN (excepto en algún virus, que puede ser de ARN); contiene la información necesaria para la síntesis de una proteína o de una molécula de ARN con una función celular específica en el organismo. Existen dos alelos por cada gen autosómico (uno paterno y otro materno), que conforman un genotipo, de modo que un individuo heterocigoto tiene dos alelos diferentes y un individuo homocigoto tiene dos alelos idénticos. El alelo más común en una población se denomina alelo salvaje o *wild type* (WT). Las frecuencias alélicas pueden variar mucho entre diferentes poblaciones étnicas. El fenotipo hace referencia al rasgo que resulta del producto proteico codificado por un gen. Sin embargo, la mayoría de los fenotipos tienen un origen complejo en el que están involucrados múltiples factores genéticos y no genéticos (edad, peso, raza, sexo, patologías asociadas, dieta, tabaco, alcohol, interacciones farmacológicas, adherencia). Los factores genéticos son responsables del 20-95% de la variabilidad en la respuesta a fármacos<sup>85,86</sup> y, a diferencia de los factores ambientales, suelen permanecer estables a lo largo de la vida de la persona, con la excepción de los tumores.

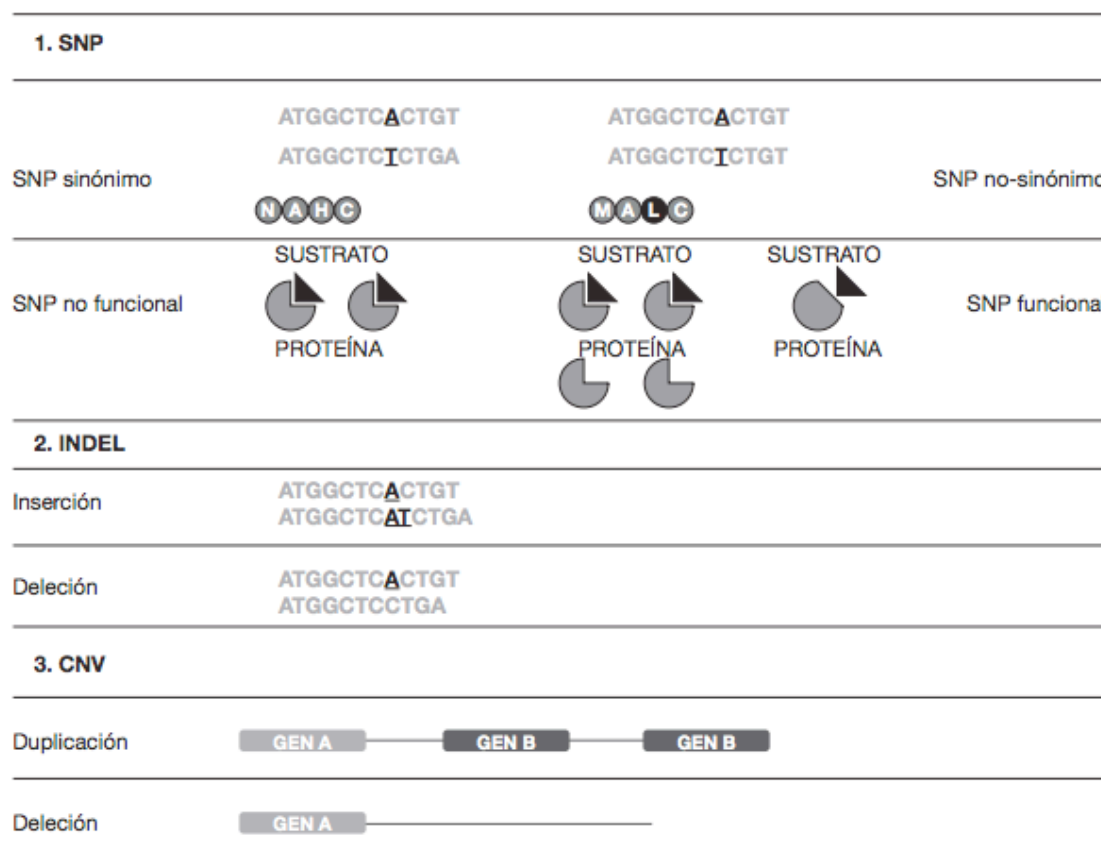
Existen mutaciones “germinales”, presentes en todas las células de un individuo, y mutaciones “somáticas”, que aparecen de forma espontánea en una célula de un individuo y por lo tanto estarán presentes solo en las células derivadas de la original. En el caso del cáncer, mientras las primeras pueden ayudar a predecir eficacia y toxicidad a un fármaco, las segundas sirven a menudo para optimizar la elección del agente quimioterápico y para mejorar la eficacia<sup>87,88</sup>.

La variación genética puede consistir en inserciones, deleciones, inversiones o variación del número de copias de un gen (CNV)<sup>88,89</sup> (Figura 10). Las variaciones genéticas más frecuentes son los polimorfismos de base única o *single nucleotide polymorphisms* (SNPs),

que representan aproximadamente el 90% de toda la variación genética en un individuo<sup>90,91</sup>, de manera que se estima que hay un SNP por cada 100-300 pares de nucleótidos. Cuando un SNP se localiza en una región codificante del genoma puede clasificarse como “SNP sinónimo”, cuando el aminoácido no varía entre las dos variantes alélicas, o “no sinónimo”, cuando la variante supone un cambio de aminoácido en la proteína resultante<sup>92</sup> (Figura 10). Un SNP también puede clasificarse como “funcional”, en caso de que altere la expresión del gen o la función de la proteína resultante, o “no funcional”, en el caso de que no tenga ningún efecto aparente.

Gracias al Proyecto Genoma Humano, se han descubierto ya más de 10 millones de SNPs y existen varias bases de datos que contienen la información conocida hasta el momento de estas variaciones, como por ejemplo la *Single Nucleotide Polymorphism database* (dbSNP) del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos<sup>93</sup>. Los SNPs están identificados por un número de referencia con las siglas “rs” (del inglés, *reference SNP*).

Figura 10. Variaciones genéticas de importancia en farmacogenética<sup>92</sup>.



El genotipado de SNPs busca correlacionar la variación en la secuencia de ADN con las diferencias fenotípicas o características visibles en un individuo. Existen múltiples técnicas que nos permiten confirmar la existencia de un SNP, como la secuenciación, el análisis de fragmentos de restricción de productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la PCR alelo-específica, el SNaPshot, la PCR a tiempo real con curvas de desnaturalización o los *microarrays*, entre otras.

En algunas ocasiones, la presencia de una mutación en un determinado *locus* del cromosoma supone una alta probabilidad de que otra mutación esté presente en una región cercana del mismo cromosoma, lo que se conoce como desequilibrio de ligamiento (LD). Estas variaciones genéticas se heredan de un individuo a otro en bloques cromosómicos o haplotipos. Así, los haplotipos se pueden identificar mediante un número relativamente reducido de SNPs o *tag SNPs* que a su vez proporcionan información del resto de SNPs presentes en esa región cromosómica. Los dos parámetros más utilizados para determinar el LD son  $D'$  y  $r^2$ , que toman valores entre 0 (equilibrio completo) y 1 (desequilibrio completo). A diferencia de  $D'$ ,  $r^2$  tiene en cuenta las frecuencias alélicas, de manera que un  $r^2$  igual a 1 significa que los dos SNPs están en completo LD, las frecuencias alélicas son idénticas y analizar uno de estos dos SNPs proporciona información del otro.

### 1.2.3.- Proyectos Genoma Humano y HapMap

Watson y Crick, hace algo más de 50 años, publicaron la estructura de la molécula de ADN<sup>94</sup>; a partir de ese momento se hicieron grandes avances en asociar alteraciones de genes con el desarrollo de enfermedades y, por tanto, en la comprensión de las bases moleculares de las mismas<sup>95</sup>.

1990 fue el año en el que se puso en marcha el Proyecto Genoma Humano, una iniciativa de los Institutos Nacionales de Salud y el Ministerio de Energía de Estados Unidos. Los objetivos de este proyecto internacional fueron tres: identificar todos los genes que componen el ADN humano, determinar la secuencia de los 3 billones de bases del ADN humano y almacenar toda esta información en potentes bases de datos. En abril del 2000 se anunció públicamente la terminación del primer borrador del genoma humano, el cual

permitió estimar que la variación entre individuos es del 0,1%<sup>96</sup> y que la mayor parte de estas diferencias se encuentran en regiones no codificantes. En octubre del 2004 se presentaron los datos de la secuenciación completa del genoma humano<sup>97</sup>.

El objetivo fundamental del Proyecto HapMap, llevado a cabo entre los años 2002 y 2006, fue desarrollar un mapa haplotípico del genoma humano en el que se describieran las pautas más frecuentes de variación genética en diferentes poblaciones<sup>98</sup>. Para ello, las muestras de ADN estudiadas provenían de las siguientes poblaciones: Yoruba en Ibadan, Nigeria (YRI), japoneses en Tokyo, Japón (JPT), chinos Han en Beijing, China (CHB) y caucásicos del norte y oeste de Europa (CEU). La importancia de este proyecto radica en que permite seleccionar el número mínimo de *tag SNPs* representativos del total de la variación genética común presente en el genoma humano.

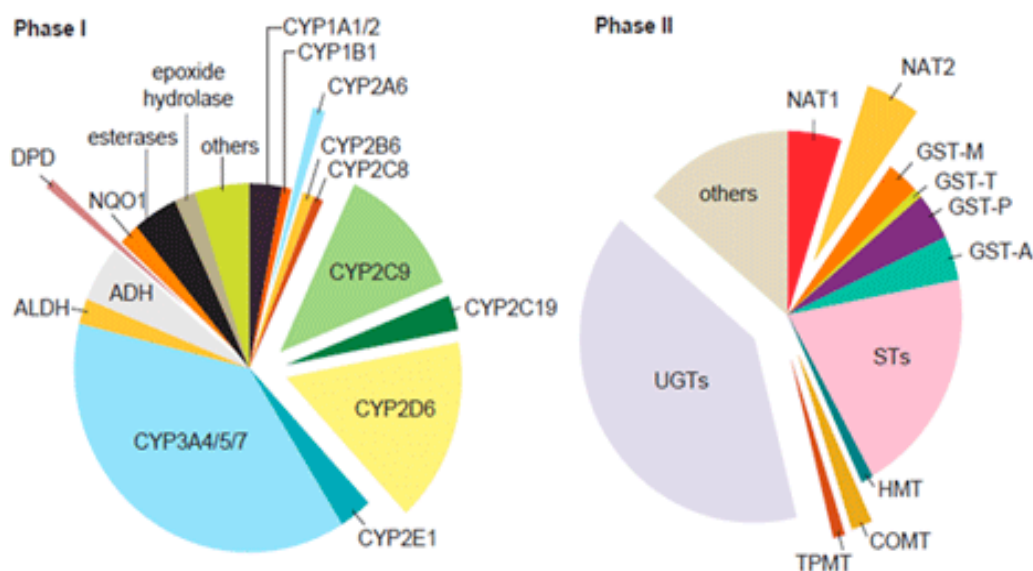
#### **1.2.4.- Áreas de estudio de la farmacogenética**

Las variaciones en los genes que codifican enzimas metabolizadoras, proteínas transportadoras y receptores de fármacos son las responsables en gran medida de la variabilidad interindividual en la respuesta a éstos<sup>99</sup>. La farmacocinética estudia la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los fármacos; la farmacodinamia, las reacciones entre los fármacos y las estructuras moleculares y tisulares. Los biomarcadores farmacogenéticos se suelen dividir en aquéllos que inciden sobre las propiedades farmacocinéticas del medicamento y aquéllos que afectan sus propiedades farmacodinámicas. En cuanto a los primeros, existen dos tipos de reacciones de metabolización: de fase I (modificación de grupos funcionales) y de fase II (conjugación de grupos funcionales) (Figura 11). Se han descrito múltiples implicaciones clínicas para polimorfismos en genes tanto de fase I como de fase II<sup>100</sup>.

Dentro del grupo de **fase I** la principal familia es la del citocromo P450 (CYP450). Dicha familia está constituida en el ser humano por 57 genes, sin embargo, el 90% de los fármacos son sustratos de unas pocas enzimas de las familias 1 a 3<sup>101</sup>. La gran mayoría de estos genes están sujetos a un elevado número de polimorfismos genéticos, lo que da lugar a la existencia de distintos genotipos y fenotipos. Un listado de todos los alelos CYP

conocidos puede encontrarse en la página web del *Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Committee*<sup>102</sup>, con la información acerca del impacto sobre la secuencia proteica y la actividad enzimática resultante.

Figura 11. Principales enzimas implicadas en el metabolismo fase I (izquierda) y fase II (derecha) de fármacos<sup>103</sup>.



En las reacciones metabólicas de **fase II**, los procesos de conjugación transforman sustancias de polaridad intermedia en otras de mayor polaridad, con el fin de que sean excretadas por la orina y las heces. Existe un elevado número de enzimas que participan en las reacciones de biotransformación de fase II (Figura 11). Igualmente, se han identificado variantes en muchos de estos genes, que afectan a la expresión o a la actividad de los mismos<sup>85</sup>.

Las **proteínas transportadoras** de fármacos juegan un papel relevante en procesos que afectan a la farmacocinética, como son la absorción, distribución y eliminación de los fármacos, así como en el desarrollo de resistencia a los mismos a través de la disminución de la captación intracelular, o bien a través de la expulsión al espacio extracelular<sup>104</sup>. De las proteínas transportadoras más estudiadas destacan las pertenecientes al grupo de los transportadores *ATP-binding cassette* (ABC), así como los transportadores de solutos. Se han descrito múltiples variantes genéticas que afectan a la expresión y/o funcionalidad de estos transportadores y su asociación con numerosos fármacos<sup>85</sup>.

Los **receptores** de fármacos inciden en la farmacodinamia de los mismos. Se han identificado numerosos polimorfismos en genes que codifican dianas de fármacos que pueden modificar la respuesta; algunos de ellos, el  $\beta_2$ -adrenorreceptor, que afecta la respuesta a  $\beta_2$ -agonistas<sup>105</sup>, y la enzima convertidora de angiotensina, que afecta la respuesta a los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina<sup>106</sup>, entre otros.

### 1.2.5.- Diseño de estudios farmacogenéticos

Básicamente, existen dos tipos de estudios farmacogenéticos en función del abordaje experimental: los estudios de genes candidatos y los estudios de genoma completo<sup>88</sup>.

Los estudios de asociación de **genes candidatos** (*candidate gene approach*) analizan directamente el efecto de variantes genéticas que codifican enzimas metabolizadoras o proteínas diana de fármacos y que, por tanto, pueden influir en el efecto de los mismos. La principal desventaja de este tipo de estudios es que dependen totalmente del conocimiento que existe en un momento determinado acerca de mecanismos de acción y rutas metabólicas de los fármacos. Sin embargo, estos estudios son comunes en la farmacogenética del cáncer<sup>87,88</sup>.

A diferencia de los anteriores, los estudios de asociación de **genoma completo** o GWAS (del inglés, *genome-wide association studies*) no cuentan con genes candidatos, sino que asumen la existencia de polimorfismos genéticos en algún lugar del genoma que afectan el fenotipo de interés, y analizan todo el genoma completo para encontrarlos. Esto se lleva a cabo mediante tecnologías de *arrays* de ADN, que comparan la actividad de múltiples genes en individuos con un fenotipo e individuos con otro fenotipo. El gran número de polimorfismos analizados en un GWAS requiere muestras muy amplias de individuos y niveles estrictos de significación estadística (del orden de  $10^{-6}$  –  $10^{-8}$ ) para evitar falsos positivos<sup>107</sup>. Este abordaje experimental ha sido aplicado recientemente en el campo de la farmacogenética sobre toxicidad a la quimioterapia en cáncer en general<sup>108</sup> y en CCR en particular<sup>109,110</sup>.

Aparte de estos dos tipos de estudios, la secuenciación de última generación (*Next Generation Sequencing*) es una nueva y potente herramienta para detectar alteraciones genéticas. Una de las aplicaciones de la ultra-secuenciación es la de obtener el exoma de un individuo, es decir, la secuencia de regiones codificantes para cada uno de los genes. En el campo de la farmacogenética, la secuenciación masiva ha creado amplias expectativas para identificar variantes raras que expliquen los efectos observados<sup>111</sup>. Prueba de esto es que el proyecto “1.000 genomas” está siendo y será usado para un análisis en profundidad de la contribución de las variaciones genéticas a la respuesta a fármacos<sup>112</sup>.



### 1.3.- Farmacogenética en cáncer colorrectal

La farmacogenética del CCR es una de las más estudiadas, de modo que se conocen bastante bien los genes implicados en las rutas de transporte, metabolismo, excreción y diana de los fármacos más utilizados en la quimioterapia del CCR. Así, se han estudiado polimorfismos en estos genes y su asociación con toxicidad y/o eficacia en pacientes de CCR tratados con fluoropirimidinas, oxaliplatino, irinotecan o anticuerpos monoclonales (cetuximab, panitumumab y bevacizumab). A pesar de existir algunas asociaciones claras y reflejadas en las fichas técnicas de algunos medicamentos, tanto a nivel de eficacia como de toxicidad, los resultados en la mayoría de los casos no son concluyentes; a menudo son incluso contradictorios.

Un ejemplo de asociación clara es el estado de KRAS y la eficacia de los anticuerpos monoclonales cetuximab y panitumumab. Se trata de un marcador predictivo de respuesta validado, de tal manera que hoy en día es obligatorio a nivel europeo analizar el estatus de KRAS previo a la utilización de estos dos fármacos, tal y como figura en las fichas técnicas de los mismos<sup>113,114</sup>.

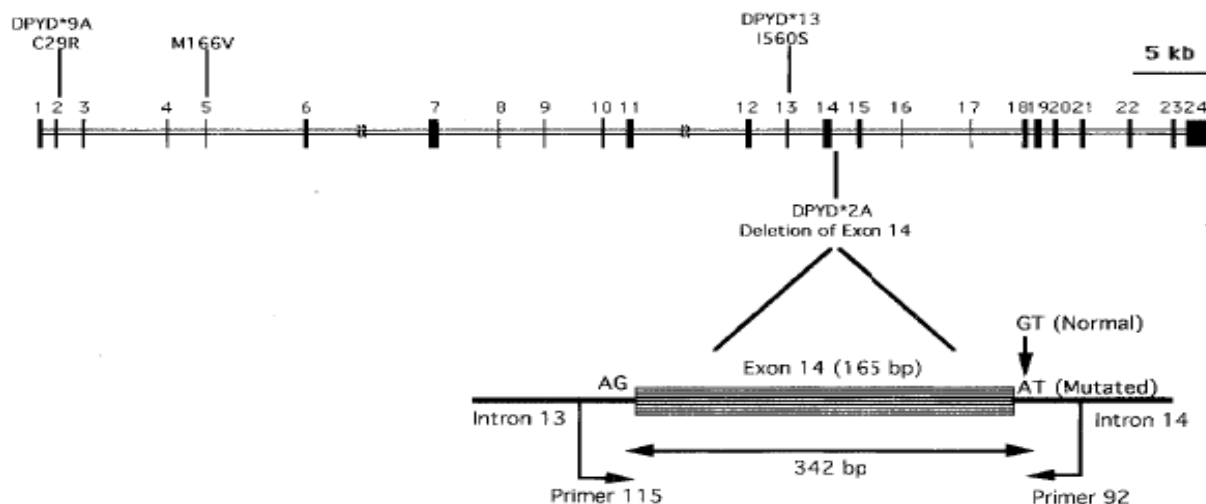
#### 1.3.1.- Fluoropirimidinas

##### 1.3.1.1.- *Dihidropirimidina deshidrogenasa*

La DPYD es una enzima clave en la metabolización de 5-FU, ya que el 80% del mismo es degradado por ella<sup>115</sup> (Figura 5). Se conocen más de 15 variantes en el gen *DPYD* y, en algunos casos, la actividad de las proteínas resultantes<sup>35</sup>. Varios polimorfismos se han asociado a baja o nula actividad de la enzima y al aumento de los niveles de 5-FU o capecitabina en pacientes portadores de estas variantes genéticas, con el consiguiente incremento del riesgo de toxicidad severa<sup>116</sup>. La variación más frecuente y estudiada es una transición de G a A en la secuencia consenso de *splicing* del exón 14, que da lugar a la delección de este exón y a una proteína modificada que no es funcional (Figura 12). Esta variante recibe el nombre de *DPYD*\*2A, IVS 14+1 o rs3918290. La FDA considera la DPYD como un biomarcador válido para predecir toxicidad tanto a 5-FU como a capecitabina<sup>117</sup> y,

por su parte, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) también hace referencia a la deficiencia de esta enzima en las fichas técnicas de ambos fármacos<sup>32,118</sup>.

Figura 12. Representación del polimorfismo rs3918290 o IVS 14+1 en *DPYD* (*DPYD*\*2A)<sup>119</sup>.



#### 1.3.1.2.- *Timidilato sintasa*

La TYMS es una enzima dimérica citosólica que cataliza la metilación de desoxiuridina 5'-monofosfato (dUMP) a desoxitimidina 5'-monofosfato (dTMP) o timidina, nucleótido necesario para la síntesis de ADN (Figura 6). El bloqueo de TYMS provoca una depleción de timidina y una acumulación de dUMP, que es incorporado al ADN produciendo errores, rotura de hebras y, finalmente, muerte celular<sup>120</sup>. Al igual que en el caso de la *DPYD*, alteraciones en los niveles de la enzima TYMS podrían afectar a la eficacia y/o toxicidad de fluoropirimidinas, al ser ésta la principal diana de 5-FU.

Polimorfismos en el gen que codifica la TYMS han demostrado influir en la respuesta al tratamiento con 5-FU. En la región *enhancer* de la *TYMS* se han descrito diversos polimorfismos, aunque dos de ellos son los más frecuentes. El primero consiste en un número variable de repeticiones, normalmente 2 (2R) ó 3 (3R), aunque se han descrito hasta 9 (9R), de una secuencia de 28 pares de bases (pb); este polimorfismo se conoce como rs34743033 o variación en el número de repeticiones en tándem (VNTR). Se ha visto que, a medida que aumenta el número de repeticiones, aumentan tanto los niveles de ARN mensajero (ARNm), como de proteína<sup>121-123</sup>. Este efecto puede ser consecuencia de la

presencia de una secuencia aguas arriba estimuladora de la transcripción (USF, del inglés *upstream stimulating factor*) de la familia E-box en cada repetición de 28 pb<sup>124,125</sup>. Además, en la posición 12 de la segunda repetición en el alelo 3R puede existir un cambio del nucleótido G por C, que elimina esta secuencia específica y disminuye la expresión de *TYMS*<sup>124</sup>. Así, se ha propuesto que el número de sitios funcionales USF E-box está relacionado directamente con los niveles de la enzima<sup>121,126</sup>.

El segundo polimorfismo consiste en una delección de 6 pb en la posición 1494 de la región 3' no traducida (3'-UTR, del inglés *untranslated region*) de este mismo gen (rs34489327); esta región modula la regulación del gen a nivel postranscripcional a través del control de la estabilidad del ARNm. Este polimorfismo se asocia con una reducción en la estabilidad del ARNm *in vitro* y una traducción reducida de la proteína TYMS en el tejido tumoral en CCR<sup>127</sup>.

#### 1.3.1.3.- Metilentetrahidrofolato reductasa

La metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR) es una enzima clave en la homeostasis y en la regulación del folato intracelular, compuesto esencial para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos. Su papel principal es catalizar la reducción de 5,10-metilentetrahidrofolato (5,10-MTHF), que es el sustrato para la síntesis *de novo* de purinas (Figura 6).

Dos polimorfismos del gen *MTHFR*, C677T (rs1801133) y A1298C (rs1801131) han sido asociados a baja actividad de la enzima, lo cual puede conducir a un cambio en los índices de toxicidad de fluoropirimidinas<sup>128,129</sup>.

#### 1.3.1.4.- Otros genes

La citidina deaminasa (**CDA**) participa en la conversión de capecitabina a 5-FU (Figura 5). Se han descrito varios polimorfismos en el gen *CDA* que se han asociado con variación en

los niveles de ARNm y con toxicidad a medicamentos: del-31C (rs3215400), C-451T (rs532545) y A79C (rs2072671)<sup>130</sup>.

Tal y como puede observarse en la Figura 5, **ABCC4** y **ABCC5** son proteínas transportadoras que expulsan el 5-FU al exterior de la célula, lo que contribuye a la resistencia a este fármaco. Sin embargo, no existen en la literatura estudios que analicen el efecto de polimorfismos en estos genes en la farmacocinética de fluoropirimidinas.

### 1.3.2.- Oxaliplatino

#### 1.3.2.1.- *Glutación S-transferasas*

Se trata de una familia de enzimas que catalizan la conjugación de glutatión a los xenobióticos electrofílicos para inactivarlos y facilitar su excreción<sup>131</sup>. Las glutatión S-transferasas (GSTs) desempeñan un papel importante en el metabolismo de compuestos potencialmente genotóxicos, por ejemplo oxaliplatino, mediante la prevención de daños en el ADN por formación de aductos (Figura 7). Se sabe que son varias las familias de genes que codifican estas proteínas, entre ellas alpha 1 (*GSTA1*), mu 1 (*GSTM1*), pi 1 (*GSTP1*), sigma 1 (*GSTS1*) y theta 1 (*GSTT1*). La isoenzima GSTP1 participa en la detoxificación de los derivados del platino y resulta ser un importante mediador de la resistencia intrínseca y adquirida al platino<sup>132</sup>. Polimorfismos en los genes que codifican estas enzimas se han asociado con cambios en la actividad enzimática.

**GSTP1** es un gen en el que se han descrito, entre otros, dos SNPs (rs1695 y rs1138272), que dan lugar a cambios de aminoácidos en las proteínas resultantes (Ile105Val y Ala114Val, respectivamente)<sup>133</sup>. Estas sustituciones de aminoácidos parecen estar dentro de los sitios activos de la GSTP1 y dan lugar a la alteración de la afinidad del sustrato<sup>134</sup>. Se ha estudiado también la asociación entre el CNV de **GSTT1** y la respuesta a oxaliplatino<sup>135-137</sup>.

### 1.3.2.2.- Sistemas de reparación de ADN

La reparación del ADN es un mecanismo importante en la resistencia a la terapia basada en platinos y, posiblemente, en el desarrollo de neurotoxicidad. Las protuberancias creadas en el ADN por los fármacos derivados del platino son reparadas por los sistemas de reparación. Por ello, polimorfismos en los genes implicados en estos sistemas pueden asociarse con una disminución en la capacidad de reparación y por tanto, conllevar un aumento en el riesgo de cáncer, además de una sensibilidad mayor a la radiación ultravioleta o ionizante y a los agentes alquilantes. Se ha demostrado que *ERCC1* (del inglés, *excision repair cross complementation 1*) y *ERCC2*, y por otro lado, *XRCC1* (del inglés, *X-ray cross complementation 1*), desempeñan papeles clave en la vía de reparación por escisión de nucleótidos y por escisión de bases, respectivamente<sup>138</sup>.

Se ha descrito que la sobreexpresión del gen ***ERCC1*** confiere a la célula tumoral una mayor capacidad reparadora frente a las lesiones generadas por el platino, lo que impide la acción citotóxica del fármaco. Además, se ha observado que la variante alélica *ERCC1* 354T (rs11615 o Asn118Asn) da lugar a unas mayores concentraciones de ARNm de *ERCC1* que las observadas en presencia del alelo *ERCC1* 354C<sup>139,140</sup>.

Por otro lado, polimorfismos genéticos en ***ERCC2*** también pueden actuar como factores de susceptibilidad genética. Concretamente, se ha visto que el SNP Lys751Gln (rs13181) se asocia a una capacidad subóptima de reparar roturas en las cromátidas en células portadoras del alelo variante<sup>138</sup>.

En cuanto a ***XRCC1***, los dos polimorfismos más estudiados llevan a una sustitución de aminoácidos en regiones del gen muy conservadas evolutivamente: Arg194Trp (rs1799782) y Gln399Arg (rs25487), lo que confiere una menor actividad a la proteína y, por tanto, una menor capacidad para reparar las lesiones inducidas por oxaliplatino. La presencia del polimorfismo Gln399Arg se ha correlacionado clínicamente con la resistencia al tratamiento con oxaliplatino<sup>141</sup>.

### 1.3.2.3.- *Receptor del factor de crecimiento epidérmico*

El gen *EGFR* es esencial para el funcionamiento celular normal, pero se ha observado que, cuando sus niveles de ARNm aumentan, hay mayor probabilidad de desarrollar metástasis y tumores más agresivos<sup>142</sup>. Los niveles de ARNm y de proteína están inversamente relacionados con el número de repeticiones del dinucleótido CA en el intrón 1 (rs45559542)<sup>143</sup>. Los pacientes con dos alelos que contienen 16 repeticiones, tienen peor respuesta a oxaliplatino/5-FU que aquéllos que tienen uno con 16 y otro con 18 ó 20<sup>144</sup>.

### 1.3.3.- Irinotecan

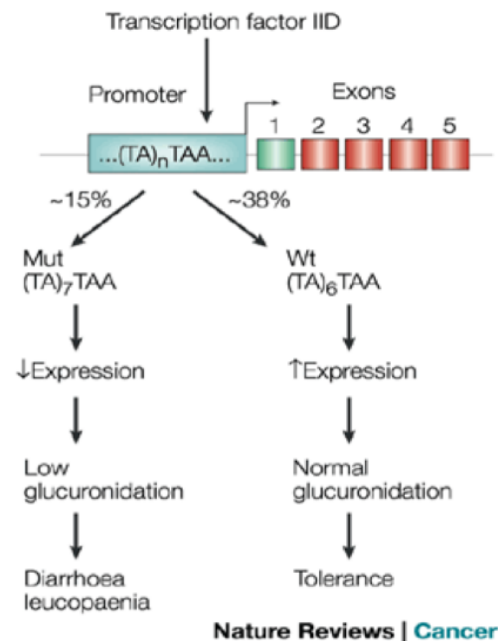
El irinotecan se transforma mayoritariamente a nivel hepático en su metabolito activo SN-38, que es el principal responsable de su acción citotóxica. Se elimina vía conjugación por uridil glucuronosil transferasas (UGTs), incluyendo las enzimas hepáticas UGT1A1, UGT1A6 y UGT1A9, y la extrahepática UGT1A7<sup>145-148</sup> (Figura 8).

#### 1.3.3.1.- *Uridil glucuronosil transferasa 1A1*

En 1997 se observó que dos pacientes con síndrome de Gilbert (déficit en la conjugación de la bilirrubina por UGT), presentaban una toxicidad hematológica grave al tratamiento con irinotecan. Ésta fue la primera evidencia clínica de que una reducción en la actividad de esta enzima estaba relacionada con mayor toxicidad al tratamiento con este fármaco<sup>149</sup>. Hoy en día se sabe que el dinucleótido TA se repite de forma variable en la región promotora del gen *UGT1A1*: la mayoría de la población tiene 6 copias (alelo *UGT1A1*\*1), pero un 10% de la población caucásica es homocigota 7/7 y hasta un 35%, heterocigota 6/7<sup>150</sup>. Esta variante recibe la denominación de *UGT1A1*\*28 o rs8175347 e implica una reducción en la actividad transcripcional del gen. Esto supone una menor glucuronidación del SN-38 con la consiguiente mayor exposición al mismo, lo que se ha relacionado con un incremento en la toxicidad hematológica y diarrea por irinotecan<sup>151-164</sup> (Figura 13). La FDA actualizó en 2004 la ficha técnica de irinotecan con la recomendación de reducir la dosis al inicio del tratamiento en pacientes homocigotos *UGT1A1*\*28 y un año más tarde aprobó el

primer test farmacogenético para analizar este polimorfismo (*Invader® UGT1A1 Molecular Assay*).

Figura 13. Representación del polimorfismo rs8175347 en *UGT1A1* e implicación en la respuesta a irinotecan<sup>165</sup>.



En este gen existe otro polimorfismo, el G-3156A (rs10929302), que ha sido asociado a niveles disminuidos de bilirrubina total y que también podría predecir toxicidad por irinotecan<sup>158,161,166</sup>.

### 1.3.3.2.- *ATP-binding cassette B1*

El irinotecan y sus metabolitos son transportados fuera de la célula por proteínas transportadoras de la familia ABC (Figura 8). El transportador relacionado con irinotecan más estudiado es ABCB1, también conocido como glicoproteína P.

Los polimorfismos más estudiados en este gen son: *ABCB1* C1236T (rs1128503), *ABCB1* G2677T/A (rs2032582) y *ABCB1* C3435T (rs1045642). Los genotipos TT se relacionan en general con una menor traducción de la proteína o una mayor exposición al fármaco<sup>167</sup>,

aunque hay estudios que muestran lo contrario<sup>168</sup>. Se ha observado que la variación C3435T afecta a la estabilidad del ARNm<sup>169</sup>.

A la vista de todos estos datos, resulta evidente que los factores genéticos juegan un papel destacado en la eficacia y toxicidad al tratamiento quimioterápico en CCR (fluoropirimidinas, oxaliplatino e irinotecan). Sin embargo, los estudios sobre biomarcadores predictivos de toxicidad a estos fármacos son todavía insuficientes y a menudo contradictorios entre sí. Esto explica la necesidad de encontrar nuevos biomarcadores y de validar los ya descritos en la literatura, para que de esta manera el oncólogo disponga de una herramienta útil para predecir si un determinado paciente va a desarrollar toxicidad severa frente a estos fármacos y pueda administrarle el fármaco más apropiado en función de su perfil genético.





## **2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## 2.1.- Hipótesis

Los polimorfismos en genes que codifican enzimas o proteínas transportadoras implicadas en las rutas metabólicas de los fármacos más frecuentemente utilizados en CCR (fluoropirimidinas, oxaliplatino e irinotecan) podrían estar relacionados con la aparición de reacciones adversas a estos fármacos. De esta manera, esos polimorfismos podrían llegar a ser potenciales marcadores farmacogenéticos para predecir toxicidad a regímenes quimioterápicos basados en 5-FU, capecitabina, oxaliplatino e irinotecan, facilitando por tanto la individualización del tratamiento en pacientes de CCR.

## 2.2.- Objetivos

El **objetivo fundamental** del estudio es identificar asociaciones significativas entre ciertas variaciones genéticas y las reacciones adversas al tratamiento quimioterápico en pacientes de CCR. Este conocimiento ayudará a seleccionar el tratamiento más efectivo y menos tóxico para un paciente determinado, es decir, a potenciar la medicina personalizada.

Para ello, se han propuesto los siguientes **objetivos secundarios**:

a.- Conocer las frecuencias genotípicas de polimorfismos potencialmente relevantes en farmacogenética del CCR.

b.- Hacer una revisión de los datos conocidos sobre farmacogenética de las reacciones adversas al tratamiento quimioterápico del CCR.

c.- Identificar polimorfismos genéticos asociados a reacciones adversas al tratamiento con regímenes quimioterápicos que contienen 5-FU en pacientes de CCR.

d.- Identificar polimorfismos genéticos asociados a reacciones adversas al tratamiento con regímenes quimioterápicos que contienen capecitabina en pacientes de CCR.

e.- Identificar polimorfismos genéticos asociados a reacciones adversas al tratamiento con regímenes quimioterápicos que contienen irinotecan en pacientes de CCR.

f.- Identificar polimorfismos genéticos asociados a reacciones adversas al tratamiento con regímenes quimioterápicos que contienen oxaliplatino en pacientes de CCR.

g.- Identificar polimorfismos genéticos asociados a reacciones adversas al tratamiento en adyuvancia con FOLFOX o XELOX en pacientes de CCR.

### **3.- MATERIAL Y MÉTODO**



### 3.1.- Tipo de estudio

El estudio presentado en esta memoria fue observacional prospectivo-retrospectivo de casos y controles, y de genes candidatos.

### 3.2.- Población de estudio

La población de estudio incluyó pacientes mayores de edad diagnosticados de CCR en cualquier estadio de la enfermedad que estuvieran o hubieran estado en tratamiento quimioterápico, todos procedentes del Servicio de Oncología Médica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM) de Madrid. El período de estudio estuvo comprendido entre 2007 y 2011, incorporándose los pacientes entre enero de 2007 y diciembre de 2009.

### 3.3.- Criterios de inclusión y de exclusión

La participación de los pacientes en el estudio fue absolutamente voluntaria y desinteresada. Para ello, el oncólogo informaba en la consulta a cada paciente sobre la finalidad del estudio y le entregaba el Documento de Información al Paciente (Anexo 1). Una vez leído éste, si estaba de acuerdo en participar, el paciente firmaba el Consentimiento Informado (Anexo 2), de acuerdo con la Ley de Investigación Biomédica del 4 de julio de 2007. Ambos documentos fueron previamente aprobados por el Comité de Ética del HGUGM y el estudio fue autorizado por el Comité de Investigación del mismo hospital.

Los **criterios de inclusión** fueron:

- Ser mayor de edad.
- Haber sido diagnosticado de cáncer de colon o recto.
- Recibir o haber recibido tratamiento quimioterápico que contuviera 5-FU, capecitabina, oxaliplatino o irinotecan. Se permitió el uso concomitante con terapias biológicas, como



cetuximab, panitumumab o bevacizumab y radioterapia.

-Leer el Documento de Información al Paciente (Anexo 1) y firmar el Consentimiento Informado (Anexo 2).

Los siguientes **criterios de exclusión** se aplicaron exclusivamente en los análisis de asociación entre variaciones genéticas y reacciones adversas al tratamiento quimioterápico:

-Tener una puntuación *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) PS mayor de 2.

-Tener daño renal o hepático previo al tratamiento.

-Tener un tiempo de seguimiento inferior a 2 meses, siempre y cuando el paciente no hubiera presentado algún efecto adverso severo en dicho periodo. Se aplicó este criterio de exclusión con el fin de evitar incluir pacientes que hubieran recibido muy pocos ciclos de quimioterapia sin toxicidad importante.

### **3.4.- Variables del estudio**

Para la consecución de los objetivos propuestos, se recogieron datos relativos al paciente, al tumor y al tratamiento recibido. Esta información se almacenó en una base de datos Microsoft Access para su posterior procesamiento y se codificaron las muestras con el fin de preservar la confidencialidad de los pacientes.

Las siguientes variables fueron registradas en la base de datos:

#### **3.4.1.- Datos personales**

- Código del paciente
- Fecha de nacimiento
- Sexo
- ECOG PS en el momento del diagnóstico
- Polimorfismos genéticos (punto 3.4.4).

### 3.4.2.- Datos del tumor

- Tipo de cáncer (colon o recto)
- Fecha de diagnóstico
- Estadío en el momento del diagnóstico.

### 3.4.3.- Datos del tratamiento

- Tratamiento previo recibido (cirugía, radioterapia, quimioterapia neoadyuvante)
- Esquema de quimioterapia recibido:
  - Fecha de inicio
  - Fecha de fin
  - Número total de ciclos recibidos
  - Línea de tratamiento (neoadyuvancia, adyuvancia, enfermedad metastásica)
  - Motivo de fin de tratamiento (petición del paciente, toxicidad inaceptable, progresión, fin programado de tratamiento, criterio médico, exitus, cirugía de rescate).

### 3.4.4.- Polimorfismos estudiados

Se seleccionaron 20 SNPs y un CNV en 14 genes que intervienen en la ruta metabólica (farmacocinética) o mecanismo de acción (farmacodinamia) de alguno de los fármacos incluidos en los análisis (Tabla 3). *EGFR* no interviene en la ruta metabólica ni mecanismo de acción de oxaliplatino, pero existen estudios que relacionan el polimorfismo rs45559542 en este gen con respuesta a oxaliplatino, por lo que se decidió incluir<sup>144</sup>.

Tabla 3. Polimorfismos/CNV seleccionados y fármacos con los que se relacionan.

Fármaco	Gen	Polimorfismo/CNV
<b>Fluoropirimidinas</b>	<i>DPYD</i>	rs3918290 rs2297595
	<i>TYMS</i>	rs34489327 rs34743033
	<i>MTHFR</i>	rs1801133 rs1801131
	<i>ABCC4</i>	rs4148551 rs3742106
	<i>ABCC5</i>	rs3805114
	<i>CDA</i>	rs2072671
	<i>XRCC1</i>	rs25487
<b>Oxaliplatino</b>	<i>ERCC1</i>	rs11615
	<i>ERCC2</i>	rs13181
	<i>GSTP1</i>	rs1695
	<i>GSTT1</i>	CNV
	<i>EGFR</i>	rs45559542
<b>Irinotecan</b>	<i>UGT1A1</i>	rs8175347 rs10929302
	<i>ABCB1</i>	rs1128503 rs2032582 rs1045642

CNV, variación del número de copias.

### 3.4.5.- Efectos adversos desarrollados y su gradación

Las toxicidades fueron revisadas según la *Common Terminology Criteria for Adverse Events* versión 3.0 (CTCAE), del Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos<sup>170</sup>. Esta clasificación cataloga las reacciones adversas a medicamentos en grados que van desde 0 (valor dentro del rango normal del parámetro en cuestión) hasta 3, 4 ó 5 (dependiendo de la reacción adversa analizada y correspondiendo 5 normalmente a la muerte del paciente). Para los distintos análisis realizados, y con el objetivo de mejorar la potencia estadística, se establecieron dos grupos: "no toxicidad", cuando el grado de la misma fue inferior a 3, y "toxicidad severa", cuando el grado fue mayor o igual a 3, excepto en el caso de SMP, que se consideró severo cuando el grado fue mayor o igual a 2, ya que el grado máximo de severidad para esta reacción adversa es 3. En el análisis de toxicidad frente a regímenes que contuvieran 5-FU o capecitabina se estudió "toxicidad severa", pero también "toxicidad moderada-severa", es decir, considerando grados de toxicidad mayores o iguales a 2.

Las reacciones adversas analizadas, agrupadas en toxicidad gastrointestinal, hematológica y otras toxicidades, se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Reacciones adversas estudiadas.

Toxicidad	Reacciones adversas (Rango CTCAE v3.0)
Gastrointestinal	Náuseas y vómitos (0-5) Diarrea (0-5) Mucositis (0-5)
Hematológica	Anemia (0-5) Neutropenia (0-5) Leucopenia (0-5) Plaquetopenia (0-5)
Otras toxicidades	Anorexia (0-5) Astenia (0-4) Reacción alérgica (0-5) Toxicidad hepática (niveles ALT/AST) (0-4) Neuropatía periférica (0-5) Reacción cutánea acneiforme (0-5) Síndrome mano-pie (0-3)

CTCAE v3.0, *Common Terminology Criteria for Adverse Events* versión 3.0; ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa.

También se tuvo en cuenta, como un efecto adverso más, la reducción de dosis de quimioterapia o el retraso en la administración de la misma por problemas de toxicidad; es decir, no se tuvieron en cuenta aquellos retrasos debidos a ajustes con los periodos vacacionales o por conveniencia del paciente.

### 3.5.- Extracción de ADN

Se aisló el ADN genómico de los pacientes incorporados a partir de una muestra de sangre con ácido etilendiaminotetracético como anticoagulante. Tras haber firmado el Consentimiento Informado (Anexo 2), se recogieron 3-5 mL de sangre de cada paciente incorporado al estudio. Las muestras fueron enviadas, ya codificadas, al Laboratorio de Farmacogenética y Farmacogenómica del HGUGM, a temperatura ambiente, y fueron almacenadas a 4 °C hasta la extracción de ADN. Para esta extracción se utilizó el *High Pure PCR template preparation kit (Roche)* a partir de 200 µL de sangre, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de sangre, que se obtuvieron exclusivamente para la extracción de ADN y la determinación de genotipos, tal y como se especifica en el

Documento de Información al Paciente (Anexo 1), se conservaron a -80 °C por si era necesaria una nueva extracción.

La concentración de ADN se determinó midiendo la absorbancia a 230, 260 y 280 nm en un espectrofotómetro *Nanodrop 1000* (Thermo Scientific, MA, USA). Todas las muestras fueron diluidas a la concentración final de 10 ng/μL.

### 3.6.- Análisis de genotipos

Para el genotipado de los distintos polimorfismos analizados, se utilizaron técnicas de biología molecular variadas. En la Tabla 5 se muestra la técnica utilizada en cada variación genética estudiada; se incluyen además otras denominaciones de los polimorfismos que se pueden encontrar en la literatura. A causa de la diversidad de nomenclaturas usadas y dado que el identificador rs de la base de datos dbSNP<sup>93</sup> es muy poco informativo, se incluye en la tabla una columna con la elección de los identificadores que serán utilizados en el texto con el objeto de facilitar el seguimiento y comprensión de esta memoria.

Tabla 5. Variaciones genéticas analizadas, nomenclatura y técnicas utilizadas para su genotipado.

Gen	Polimorfismo/CNV			Técnica de genotipado
	Identificación rs (dbSNP)	Otras denominaciones (PharmGKB)	Identificación en el texto de esta memoria	
DPYD	rs3918290	67887533 G>A, IVS14 + 1G>A, 1905+1G>A	DPYD*2A	PCR a tiempo real con sondas TaqMan
	rs2297595	496A>G, Met166Val	DPYD A496G	SNaPshot
TYMS	rs34489327	6-basepair 3'UTR repeat, 1494del, 1494del TTAAAG, 145-370delT, 145-370delTinsCTTTAA, 449delA, 449delAinsTTAAAG, 859delT, 859delTinsCTTTAA, ttaaag	TYMS 6del	PCR y electroforesis
	rs34743033	28-bp tandem repeats, CCGCGCCACTTGGCCTGCCTCCGTCCCG, TSER *2/*3, TSER 28-basepair 5'UTR enhancer region repeat	TYMS USF E-box	PCR, digestión y electroforesis
MTHFR	rs1801133	677C>T, 665C>T, Ala222Val, A222V	MTHFR C677T	SNaPshot

	rs1801131	1286A>C, Glu429Ala	<i>MTHFR</i> A1298C	SNaPshot
<i>ABCC4</i>	rs4148551	-	<i>ABCC4</i> A311G	SNaPshot
	rs3742106	38T>G	<i>ABCC4</i> T38G	SNaPshot
<i>ABCC5</i>	rs3805114	-	<i>ABCC5</i> A1366C	SNaPshot
<i>CDA</i>	rs2072671	79A>C, K27Q, Lys27Gln	<i>CDA</i> Lys27Gln	SNaPshot
<i>XRCC1</i>	rs25487	1196A>G	<i>XRCC1</i> Gln399Arg	SNaPshot
<i>ERCC1</i>	rs11615	19007T>C, 354T>C	<i>ERCC1</i> Asn118Asn	PCR y secuenciación
<i>ERCC2</i>	rs13181	2251A>C, rs13181:T>G	<i>ERCC2</i> Lys751Gln	SNaPshot
<i>GSTP1</i>	rs1695	GSTP1*2, GSTP1*B, A313G, 313A>G, rs1695:A>G, I105V	<i>GSTP1</i> Ile105Val	SNaPshot
<i>GSTT1</i>	NA	-	<i>GSTT1</i> CNV	<i>TaqMan Copy Number Assay</i>
<i>EGFR</i>	rs45559542	-	<i>EGFR</i> intrón 1 (CA) <sub>n</sub>	PCR y electroforesis
<i>UGT1A1</i>	rs8175347	7, 7-TA insertion in promoter, TA, microsatellite, short tandem repeat	<i>UGT1A1</i> *28	PCR y electroforesis
	rs10929302	-3156G>A, G-3156A	<i>UGT1A1</i> *93	SNaPshot
<i>ABCB1</i>	rs1128503	ABCB1*8, 1236T>C, mRNA 1654T>C, Gly412Gly	<i>ABCB1</i> C1236T	SNaPshot
	rs2032582	3095G>T/A, ABCB1*7, A893S, 2677G>T/A, Ala893Ser/Thr, MDR1 G2677T/A, mRNA 3095G>T/A, Ala893Ser/Thr	<i>ABCB1</i> G2677T/A	SNaPshot
	rs1045642	ABCB1*6, 3435C>T, Ile1145Ile, MDR1 3435C>T, MDR1 C3435T, PGP C3435T, mRNA 3853C>T	<i>ABCB1</i> C3435T	SNaPshot

CNV, variación del número de copias; dbSNP, *Single Nucleotide Polymorphism database*; PharmGKB, *The Pharmacogenomics Knowledgebase*; NA, no aplica.

### 3.6.1.- PCR y electroforesis

Los SNPs rs34489327 (*TYMS* 6del), rs45559542 [*EGFR* intrón 1 (CA)<sub>n</sub>] y rs8175347 (*UGT1A1*\*28) se determinaron mediante PCR y electroforesis del producto de amplificación. Se utilizaron dos oligonucleótidos flanqueantes a cada SNP (F y R), uno de los cuales (F) estaba marcado mediante fluorescencia (6-FAM) (Tabla 6). Las condiciones de esta PCR se detallan en la Tabla 7.

Tabla 6. Secuencia de los oligonucleótidos diseñados para la PCR utilizada en el genotipado de los polimorfismos *TYMS* 6del, *EGFR* intrón 1 (CA)<sub>n</sub> y *UGT1A1*\*28.

Gen	Polimorfismo	Secuencia del oligonucleótido F PCR (5'→ 3')	Secuencia del oligonucleótido R PCR (5'→ 3')
<i>TYMS</i>	6del	6FAM-CTCAAATCTGAGGGAGCTGAG	GCAGAACACTTCTTTATTATAG
<i>EGFR</i>	intrón 1 (CA) <sub>n</sub>	6FAM-GGGCTCACAGCAAACCTTCTC	AAGCCAGACTGCCTCATGTT
<i>UGT1A1</i>	<i>UGT1A1</i> *28	6FAM-TCACGTGACACAGTCAAACATT	CAGCATGGGACACCACTG

PCR, reacción en cadena de la polimerasa.

Tabla 7. Condiciones de la PCR utilizada para el genotipado de los polimorfismos *TYMS* 6del, *EGFR* intrón 1 (CA)<sub>n</sub>, *UGT1A1*\*28 y *ERCC1* Asn118Asn.

Componente	Vol (μL)	Proceso	Tª (°C)	Tiempo
2X PCR <i>Master Mix</i> (Promega)	12,5	Activación	95	5 min
Oligonucleótido F (10 μM)	2	Desnaturalización	94	30 s
Oligonucleótido R (10 μM)	2	Anillamiento	60	40 s
Agua	7,5	Extensión	72	90 s
ADN genómico (10 ng/μL)	1	Extensión final	72	5 min
Volumen total	25	Mantenimiento	4	

Vol, volumen; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; ADN, ácido desoxirribonucleico; Tª, temperatura.

Los productos de PCR fueron purificados mediante *Illustra ExoSapIt* (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones de la Tabla 8.

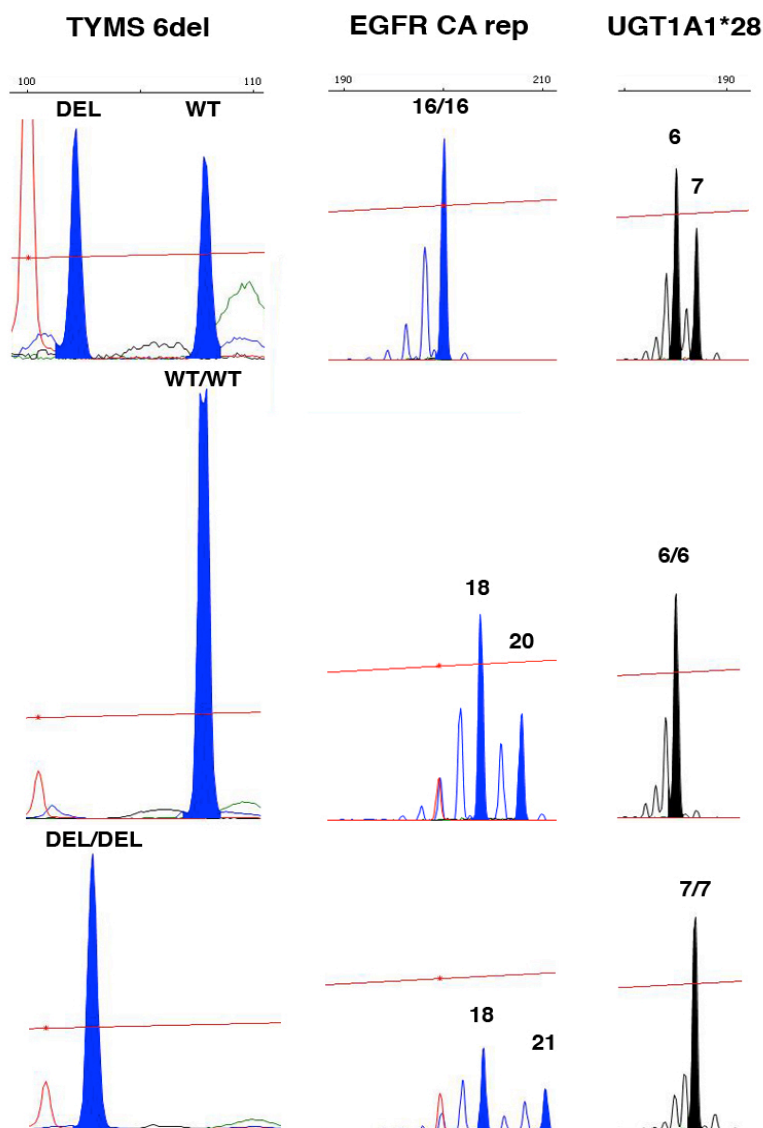
Tabla 8. Condiciones de purificación por *ExoSapIt*.

Componente	Vol (μL)	Proceso	Tª (°C)	Tiempo
Producto de PCR	5	Incubación	37	1 h
<i>ExoSapIt</i>	1	Inactivación	80	15 min
Volumen total	6			

Vol, volumen; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; Tª, temperatura.

El producto purificado (1 μL) fue sometido a una electroforesis de alta resolución en el equipo *ABIprism 3100* (Life Technologies), en la Unidad de Secuenciación del HGUGM (Figura 14).

Figura 14. Electroferogramas obtenidos para diferentes genotipos en *TYMS* 6del (del/WT, WT/WT y del/del), *EGFR* intrón 1 (CA)<sub>n</sub> (16/16, 18/20 y 18/21) y *UGT1A1*\*28 (6/7, 6/6 y 7/7).

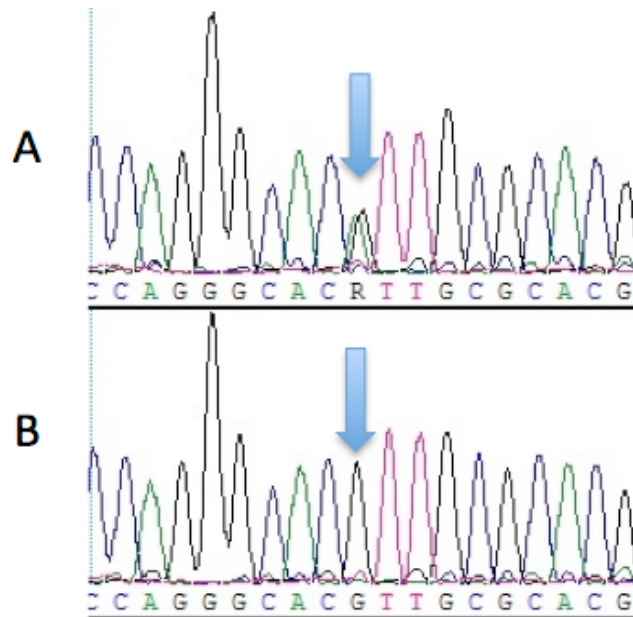


### 3.6.2.- PCR y secuenciación

El SNP rs11615 (*ERCC1* Asn118Asn) se determinó mediante PCR y secuenciación de los fragmentos amplificados en la Unidad de Secuenciación del HGUGM (Figura 15). Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: TCCAGAACACTGGGACATGA (F) y TCCCTATTGATGGCTTCTGC (R) en las condiciones de PCR y de purificación del producto de amplificación que se detallan en las Tablas 7 y 8, respectivamente.



Figura 15. Electroferograma de la reacción de secuenciación de *ERCC1*. Las flechas indican la posición del polimorfismo *ERCC1* Asn118Asn. A) Heterocigoto GA; B) Homocigoto GG.



### 3.6.3.- PCR, digestión y electroforesis

El SNP rs34743033 en *TYMS* (USF E-box) fue analizado mediante amplificación de la región que lo contiene por PCR y mediante análisis del tamaño de los productos de amplificación. Los oligonucleótidos que se utilizaron en la PCR fueron: GTGGCTCCTGCGTTTCCCC (F) y GCTCCGAGCCGGCCACAGGCA (R), y las condiciones de la reacción se especifican en la Tabla 9.

Tabla 9. Condiciones de la PCR utilizada para el genotipado del polimorfismo *TYMS* USF E-box.

Componente	Vol (μL)	Proceso	Tª (°C)	Tiempo
2X PCR <i>Master Mix</i> (Promega)	25	Activación	95	5 min
Oligonucleótido F (10 μM)	4	Desnaturalización	94	30 s
Oligonucleótido R (10 μM)	4	Anillamiento	60	60 s
Dimetilsulfóxido	5	Extensión	72	90 s
Agua	7	Extensión final	72	5 min
ADN genómico	5	Mantenimiento	4	
Volumen total	50			

Vol, volumen; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; ADN, ácido desoxirribonucleico; Tª, temperatura.

El producto amplificado se purificó mediante *High Pure PCR product purification kit* y posteriormente fue digerido con la enzima de restricción HaeIII (ambos de *Roche Applied Science*) (Figura 16). Para ello se incubaron 8  $\mu$ L del producto de amplificación con 1  $\mu$ L de HaeIII y 1  $\mu$ L de tampón de restricción a 37 °C durante 1 h. Una vez transcurrido este periodo, la enzima se inactivó mediante calor a 65 °C durante 15 min. Finalmente, los productos de la amplificación y los resultantes de la digestión fueron analizados tras electroforesis en *chip* mediante el *Bioanalyzer 2100* y reactivos *DNA1000 kit* (*Agilent Technologies*), según las instrucciones del fabricante. Así, la amplificación de la región que contiene 2 repeticiones de 28 pb se correspondería con una banda de 214 pb, mientras que la de 3 repeticiones se correspondería con una banda de 242 pb de tamaño, tal y como puede observarse en la Figura 17.

Figura 16. Esquema representando el fragmento de PCR amplificado en *TYMS* que contiene el polimorfismo *TYMS* USF E-box. Las barras azules representan los sitios de corte de la enzima HaeIII. Entre las barras se muestra el tamaño esperado de los fragmentos generados. Las cajas “G” y “C” representan una repetición de 28 pares de bases con la secuencia G o C, respectivamente, en la posición polimórfica.

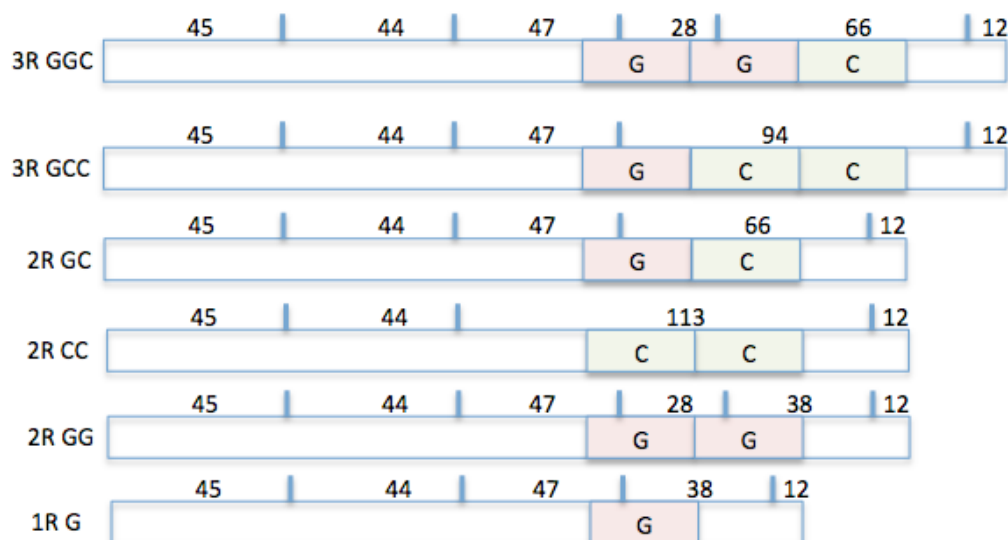
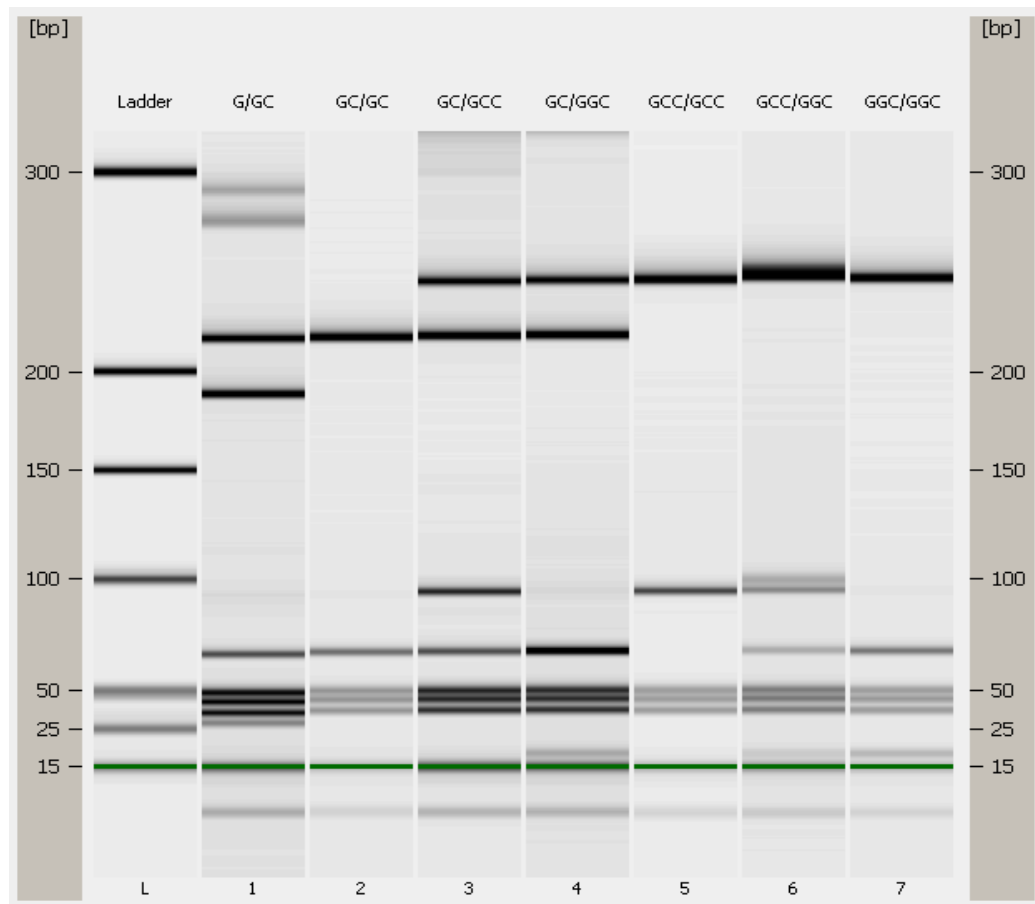


Figura 17. Gel de electroforesis mostrando los productos amplificados para *TYMS* USF E-box. Las bandas de 242, 214 y 186 representan 3, 2 y 1 repetición, respectivamente de la región de 28 pares de bases. Por debajo de 150 pares de bases se observan las bandas correspondientes al producto digerido con *HaeIII*.

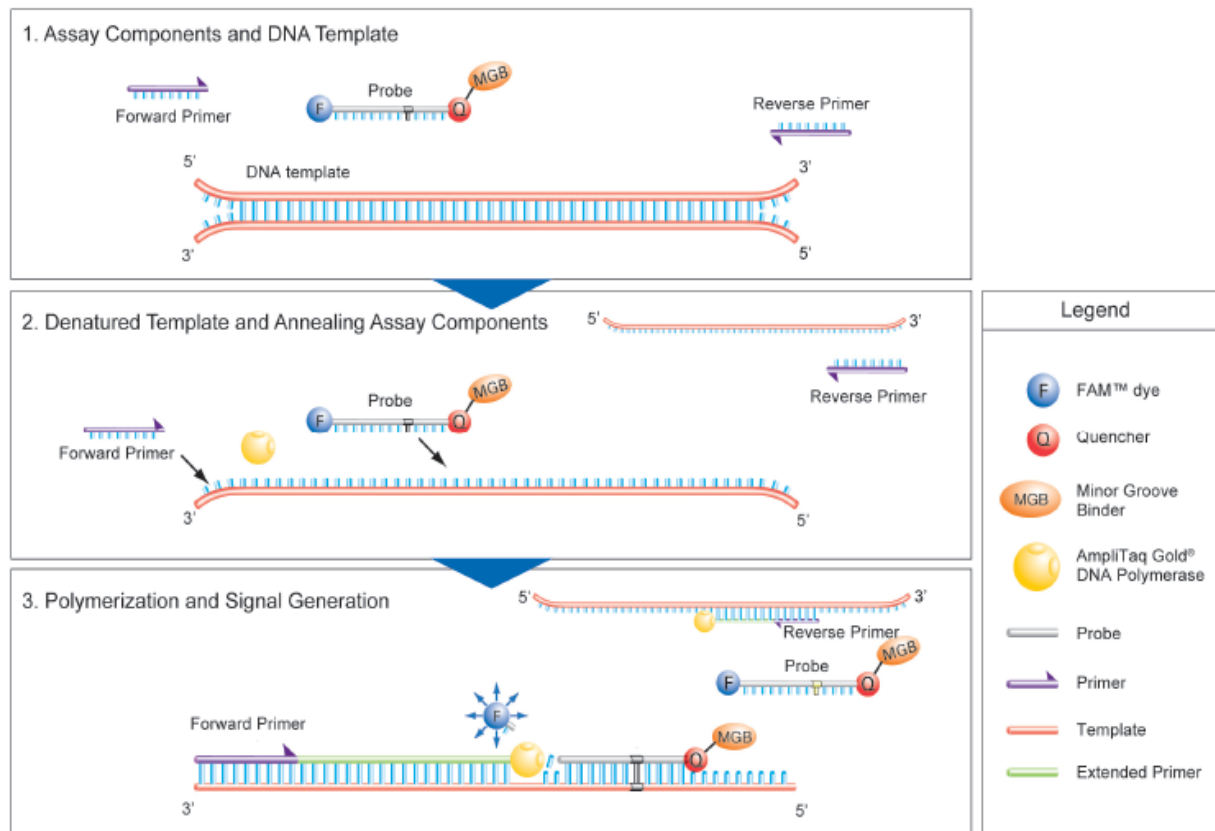


### 3.6.4.- PCR a tiempo real con sondas TaqMan

El SNP rs3918290 (*DPYD*\*2A) fue analizado mediante PCR a tiempo real y sondas TaqMan. Se sintetizaron sondas *TaqMan*® *SNP genotyping Assay* para este polimorfismo. El procedimiento está esquematizado en la Figura 18. Cada una de estas sondas TaqMan está compuesta por cuatro oligonucleótidos: dos que flanquean la secuencia a analizar (F y R) y dos internos que contienen el SNP que se interrogará con las dos posibles secuencias, cada uno de estos últimos marcado con un fluoróforo diferente (VIC y 6-FAM). Estos dos oligonucleótidos marcados con moléculas fluorescentes portan además un *quencher* que absorbe y enmascara la fluorescencia de VIC y 6-FAM por proximidad. Durante la PCR, los oligonucleótidos marcados reconocen la secuencia homóloga y se unen sólo si la secuencia es totalmente complementaria. Y durante el paso de extensión de la Taq ADN polimerasa

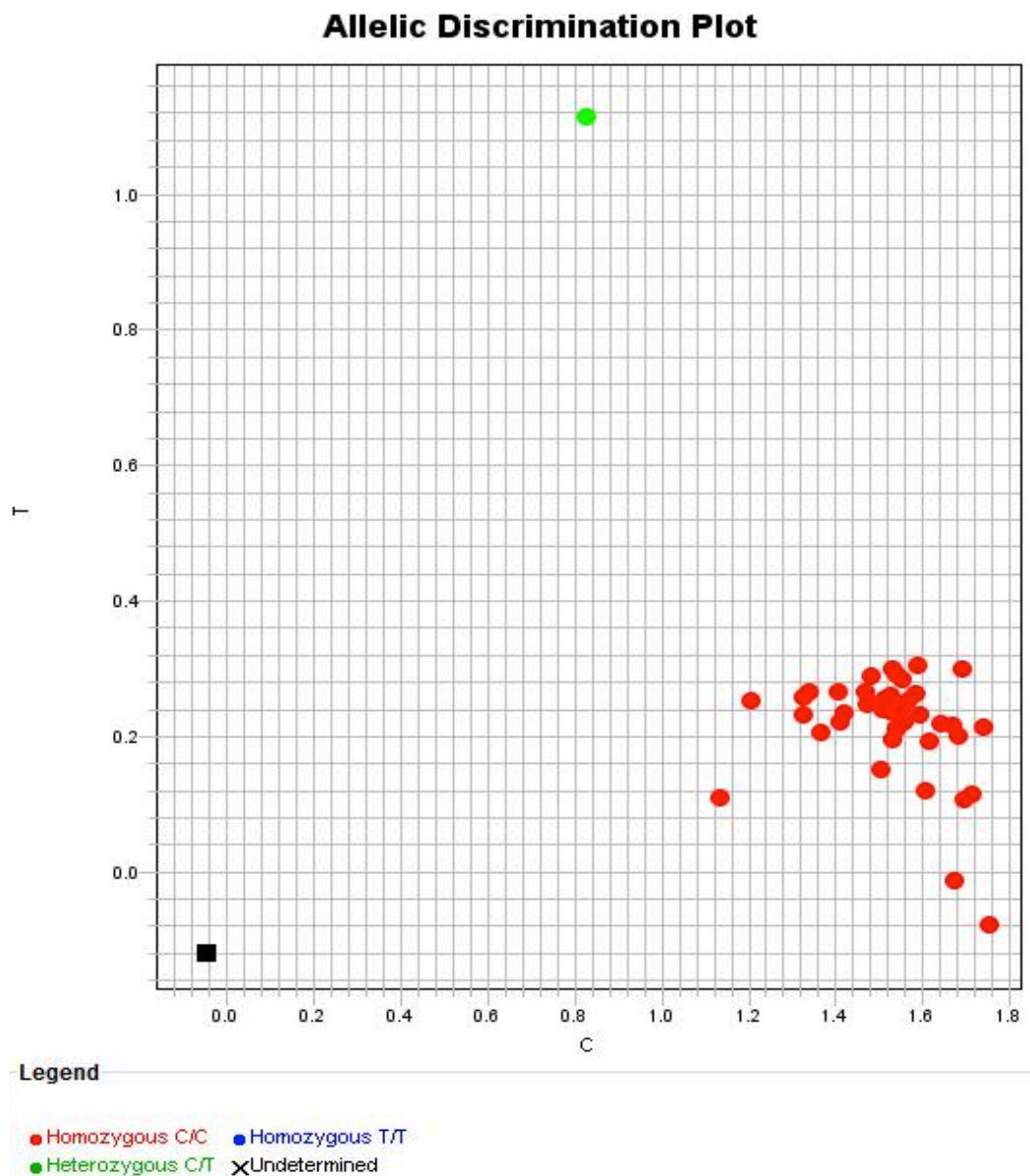
ésta llega al oligonucleótido marcado, liberando el *quencher* y permitiendo la emisión del fluoróforo correspondiente a la secuencia homóloga.

Figura 18. Procedimiento de genotipado mediante sondas TaqMan. Copyright © 2013 Life Technologies Corporation. Usado bajo licencia<sup>171</sup>.



En el caso de que el paciente sea heterocigoto para el SNP en cuestión, se observarán los dos tipos de fluorescencia; si el paciente es, por el contrario, homocigoto, se observará únicamente una de las dos fluorescencias, indicándonos si es homocigoto salvaje o mutado. Las sondas fueron diseñadas y sintetizadas por *Life Technologies*. La reacción de PCR se realizó en el equipo *StepOnePlus* usando *TaqMan® GTXpress Master Mix (Life Technologies)*, la sonda TaqMan correspondiente y el ADN de los pacientes, según instrucciones del fabricante. Los resultados fueron analizados usando el software *StepOnePlus* versión 2.2 (Figura 19).

Figura 19. Gráfica de discriminación alélica con los diferentes genotipos para *DPYD*\*2A utilizando sondas TaqMan. Cada punto representa la muestra de un paciente.



### 3.6.5.- SNaPshot

El resto de SNPs [rs10929302 (*UGT1A1*\*93), rs1128503 (*ABCB1* C1236T), rs2032582 (*ABCB1* G2677T/A), rs1045642 (*ABCB1* C3435T), rs25487 (*XRCC1*), rs13181 (*ERCC2*), rs1695 (*GSTP1*), rs1801133 (*MTHFR* C677T), rs1801131 (*MTHFR* A1298C), rs4148551 (*ABCC4* A311G), rs3742106 (*ABCC4* T38G), rs2072671 (*CDA*), rs3805114 (*ABCC5*) y rs2297595 (*DPYD* A496G)] se analizaron mediante la técnica de SNaPshot. Esta técnica

permite el genotipado de hasta quince SNPs en una única reacción y, básicamente, tiene tres pasos. En el primero de ellos se lleva a cabo una reacción múltiple de PCR mediante la cual el ADN de los pacientes es amplificado en un termociclador (Tabla 10).

Tabla 10. Condiciones de la PCR inicial de la técnica SNaPshot.

Componente	Vol (μL)	Proceso	Tª (°C)	Tiempo
2X Qiagen Multiplex PCR Master Mix	10	Activación	95	15 min
Mezcla de oligonucleótidos	4	Desnaturalización	94	30 s
Agua	4	Anillamiento	60	90 s
ADN genómico	2	Extensión	72	90 s
Volumen total	20	Extensión final	72	5 min
		Mantenimiento	4	

Vol, volumen; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; ADN, ácido desoxirribonucleico; Tª, temperatura.

En esta reacción se combinan todos los oligonucleótidos F y R (Tabla 11) para dar lugar a productos de amplificación de tamaños diferentes. Después de comprobar la correcta amplificación por electroforesis con el *BioAnalyzer 2100* y el *kit DNA1000* (*Agilent Technologies*), el producto de PCR es purificado mediante *ExoSapIt* (*GE Healthcare*), con el fin de digerir los nucleótidos no incorporados y defosforilar el exceso de oligonucleótidos para que éstos no interfieran en la reacción de SNaPshot (Tabla 8).

En el segundo paso, una vez obtenidos los productos de PCR que contienen los SNPs para genotipar, se realiza la reacción de SNaPshot mediante el *SNaPshot Multiplex Kit* (*Life Technologies*), según las recomendaciones del fabricante. En ella se produce la extensión de un oligonucleótido diseñado adyacente al SNP de interés por uno de los cuatro dideoxinucleótidos trifosfato marcados mediante fluorescencia. Estos oligonucleótidos, puesto que intervienen en una reacción múltiple, son diseñados con un tamaño diferente para poder ser diferenciados más adelante en la electroforesis capilar (Tabla 11). Los nucleótidos que se utilizan en esta reacción tienen una modificación estructural que impide a la Taq ADN polimerasa seguir añadiendo más nucleótidos, y además están marcados con un fluorocromo distinto que permitirá diferenciarlos más adelante. Una vez finalizada la reacción de SNaPshot, la mezcla se trata con fosfatasa alcalina para impedir que las extensiones sigan teniendo lugar (Tabla 12).

Tabla 11. Identificación de los polimorfismos estudiados y secuencia de los oligonucleótidos diseñados para la reacción SNaPshot.

Gen	Polimorfismo	Secuencia del oligonucleótido F PCR (5'→ 3')	Secuencia del oligonucleótido R PCR (5'→ 3')	Secuencia del oligonucleótido interno SNaPshot (5'→ 3') (nº nucleótidos)	Reacción SNaPshot
<i>MTHFR</i>	C677T	TCACAAAGCGGAAGAAGT	GCCTCTCCTGACTGTCATC	AGAATGTGTCAGCCTCAAAGAAAAGCTGCGTGATGATGAAATCG (44)	A
	A1298C	CTTTGTGACCATTCGGTTT	TTTGGGGAGCTGAAGGACTA	TCCGGTTTGGTTCTCCGAGAGGTAAAGAACAAAGACTTCAAAGACACTT (50)	A
<i>ABCC4</i>	A311G	ATGTCAAGTCCGTTCCGAAG	TTTGGGGGCAATAAAAACAA	GTCAAAGCTCATTTTTAAAGGAGTAGGACA (30)	A
	T38G	CCTGCACCTCTGATTTGGAT	CCTGCTGAGGGTTTTAGTGG	T <sub>10</sub> CACTGTGAATCCAACCAAAATGTCAAGTCCGTTCCGAAGGCATTT (55)	A
<i>XRCC1</i>	Gln399Arg	TCTGACTCCCCTCCAGATT	GCCCCTCAGATCACACCTA	T <sub>40</sub> GGCGTGTGAGGCCTTACCTC (60)	A
<i>ERCC2</i>	Lys751Gln	GGCAAGACTCAGGAGTCACC	CCCTCTCCCTTCTCTGT	T <sub>39</sub> AGCAGCTAGAATCAGAGGAGACGCTG (65)	A
<i>GSTP1</i>	Ile105Val	CTCTATGGGAAGGACCAGC	GACAGCAGGGTCTCAAAA	CTTGCCCGCCTCATAGTTGGTGTAGATGAGGGAGA (35)	A
<i>DPYD</i>	A496G	CAATCGAGCCAAAAAGGAAG	CCCTCTAGGTGGGAGTAGGG	AAATTTTAACCATGACAATTGATTTCCCCGTAGGTA TTCAAAGCA (45)	B
<i>ABCC5</i>	A1366C	TTGCTGAACACCTTGTGGAA	TACCAGTCCTTCCCAGATGC	T <sub>16</sub> GGAAGCAAAAATCTGAAAATGTGAATAAAATTA TTTTGGATTTTGTA (65)	B
<i>CDA</i>	Lys27Gln	CTGAAGCCTGAGTGTGTCCA	CCATCCAACCTCCTTCCTCA	TTTTTCCTGAGTGTGTCCAGCAGCTGCTGGTTTGCTC CAAGGAGGCCAAG (50)	B
<i>UGT1A1</i>	<i>UGT1A1</i> *93	CAAAGGAAGTTTGGGGAACA	CACCACCACTTCTGGAACCT	GGTAAGAGGCAGAGGGAGGGGGCAAGCAGAAGGGCT AGAGAGGAGGAATGAGCTT (55)	B
<i>ABCB1</i>	C1236T	CCTGACTCACCACACCAATG	TATCCTGTGTCTGTGAATTGCC	GCCCACTCTGCACCTTCAGGTTTCAG (25)	B
	G2677T/A	TAGTTTGACTCACCTTCCCGG	GGCTATAGGTTCCAGGCTTG	GACAAGCACTGAAAGATAAGAAAGAACTAGAAGGT (35)	B
	C3435T	CATGCTCCCAGGCTGTTTAT	GTAACCTGGCAGTTTCAGTG	TGACTCGATGAAGGCATGTATGTTGGCCTCCTTTGC TGCCCTCAC (45)	B

PCR, reacción en cadena de la polimerasa.

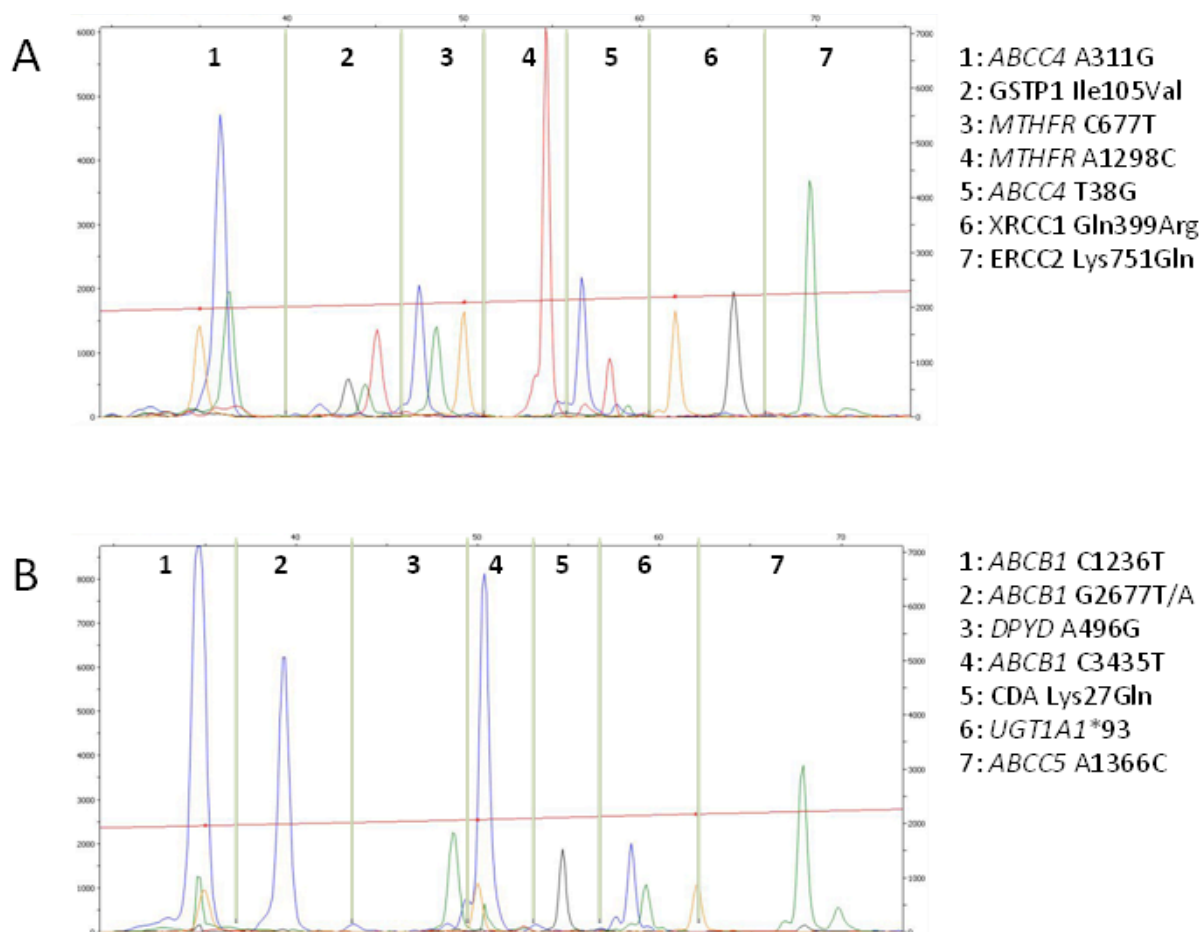
Tabla 12. Condiciones de la reacción de SNaPshot.

Componente	Vol (μL)	Tª (°C)	Tiempo
Mix SNaPshot	2,5	96	10 s
Producto de PCR	1,5	50	5 s
Mezcla de oligonucleótidos	0,5	60	30 s
Agua	0,5	4	Pausa
Volumen total	5	Adición de 0,5 μL de fosfatasa alcalina	
		37	1 h
		75	15 min
		4	

Vol, volumen; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; Tª, temperatura.

Los productos extendidos tras la reacción de SNaPshot son finalmente separados en el tercer paso mediante un secuenciador capilar *ABI Prism 3100* y los SNPs son discriminados utilizando el software *PeakScan* versión 1.0 (*Life Technologies*) (Figura 20).

Figura 20. Electroferogramas de las reacciones de SNaPshot. Resolución de 14 polimorfismos por SNaPshot en dos reacciones independientes: A y B (Tabla 11). Cada uno de los polimorfismos está indicado por un número cuya información se encuentra a la derecha de la figura. El código de colores para identificar los nucleótidos empleados es: azul (G), verde (A), negro (C) y rojo (T).

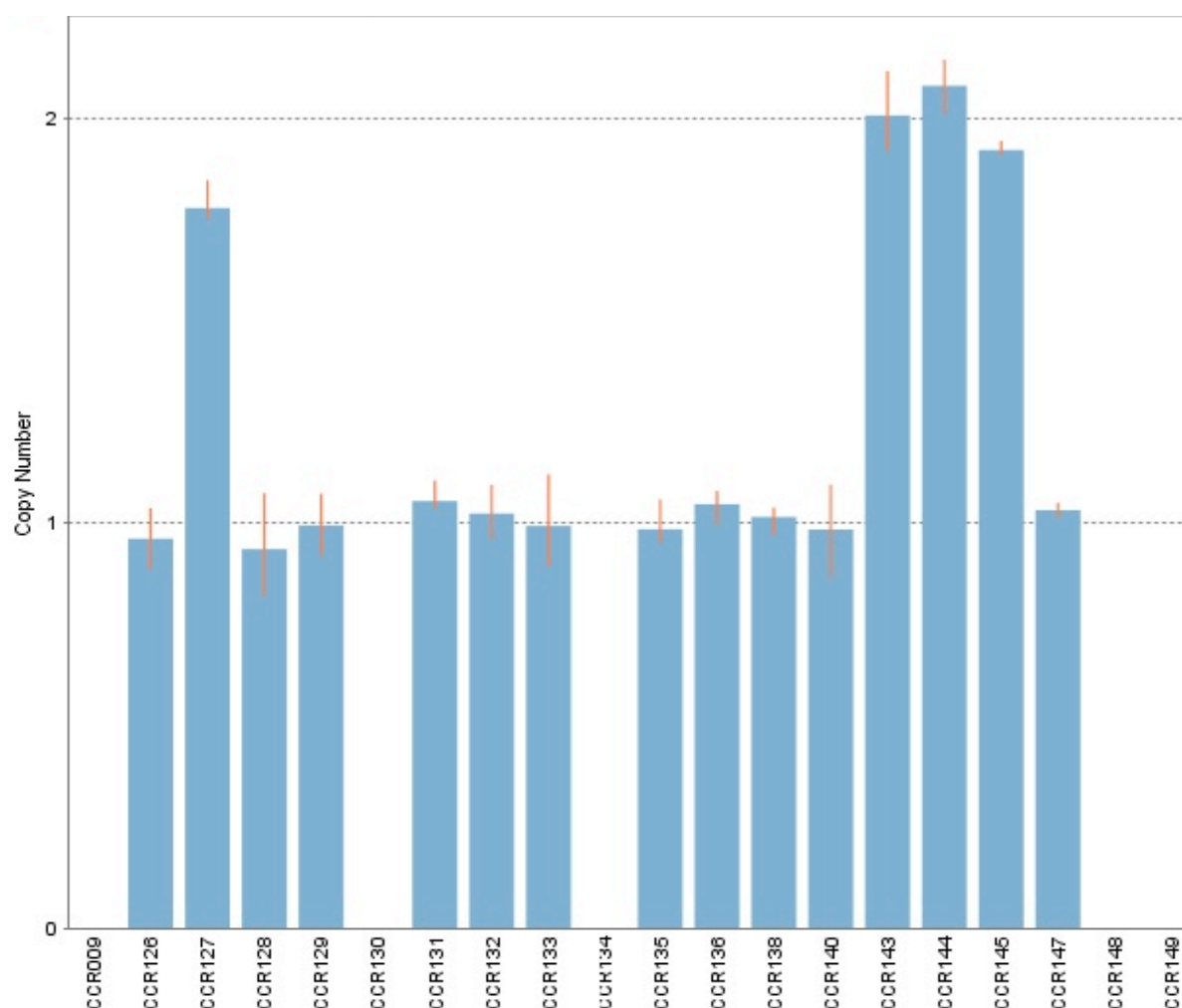




### 3.6.6.- Número de copias

Se cuantificó el CNV del gen *GSTT1* mediante *TaqMan® Copy Number Assay*. Básicamente, se amplificaron mediante PCR a tiempo real el gen *GSTT1* y el *RNaseP*, que se utilizó como referencia para la normalización. Así, uno de los oligonucleótidos que amplifica *RNaseP* estaba marcado con VIC, mientras que uno de los que amplifican el gen *GSTT1* lo estaba con 6-FAM. Las muestras fueron amplificadas usando la PCR a tiempo real *StepOnePlus* y *TaqMan® GTXpress Master Mix*, según las instrucciones del fabricante (*Life Technologies*). Los resultados de la PCR a tiempo real se exportaron al software *Copy Caller* versión 1.0 (*Life Technologies*), mediante el cual se calculó el número de copias (Figura 21).

Figura 21. Diagrama mostrando el número de copias de *GSTT1*. En el eje de ordenadas se representa el número de copias del gen: 0, 1 ó 2; en el eje de abscisas, cada barra representa la muestra de un paciente.



### 3.7.- Análisis estadístico

Se creó una base de datos en el programa Microsoft Access con todas las variables anteriormente especificadas (punto 3.4).

Para determinar si los genotipos cumplían el equilibrio de Hardy-Weinberg se utilizó la siguiente fórmula:

$p^2 + 2pq + q^2 = 1$ , siendo  $p^2$  la frecuencia esperada para los homocigotos de uno de los alelos,  $2pq$  la frecuencia esperada para los heterocigotos y  $q^2$  la frecuencia esperada para los homocigotos del otro alelo. Se aplicó el test  $\chi^2$  de Pearson para analizar la diferencia entre las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas, y se consideró  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.

Para el análisis de LD entre polimorfismos (determinación de parámetros  $D'$  y  $r^2$ ) se utilizó la calculadora online disponible en la página web *Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies*<sup>172</sup>.

Las variables cualitativas se expresaron mediante sus frecuencias en porcentajes. La asociación entre polimorfismos y efectos adversos se estudió mediante la prueba exacta de Fisher y el test  $\chi^2$  de Pearson asociación lineal por lineal (análisis univariante). Se determinó la fuerza de la asociación mediante *odds ratios* (OR) con sus correspondientes intervalos de confianza (IC) al 95% y mediante modelos de regresión logística multivariante para las asociaciones que fueron estadísticamente significativas en el análisis univariante. Este modelo multivariante incluyó el genotipo, el sexo y el PS de los pacientes.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa *Statistical Package for the Social Sciences* versión 15.0 (SPSS, Inc). En todos los análisis se consideró  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.

### **3.8.- Aspectos éticos**

El estudio se llevó a cabo según lo establecido en la Declaración de Helsinki (Edimburgo, 2000) y en el Convenio para la protección de los Derechos Humanos y la dignidad del ser humano con respecto a las aplicaciones de la Biología y la Medicina (Oviedo, 1997). Igualmente se siguió la normativa sobre protección de datos de carácter personal que exige la legislación española (Ley Orgánica 15/1999), la Ley 41/2002, básica reguladora del principio de autonomía y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica, y la Ley de Investigación Biomédica. El estudio fue también revisado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del HGUGM.

#### **4.- RESULTADOS**



#### 4.1.- Características basales de los pacientes

En el estudio que se presenta en esta memoria fueron incluidos un total de 137 pacientes, todos ellos diagnosticados de CCR y tratados en el HGUGM (los datos demográficos se detallan en la Tabla 13). Básicamente, los pacientes fueron en su mayoría hombres (59,1%) y la mediana de la edad al diagnóstico fue 70 años (60-77). La mayoría tenía un PS de 0-1 en el momento del diagnóstico y la incidencia de cáncer de colon (66,4%) fue mayor que la de recto (33,6%). La mediana del tiempo de evolución de la enfermedad desde el diagnóstico fue 4 años (3-5) y en la mayoría de los casos (54,7%) se detectó el cáncer ya en un estadio IV. Antes de iniciar quimioterapia, la cirugía fue la opción más común de tratamiento (60,6%), aunque una proporción considerable de pacientes (29,9%) no había recibido ningún tratamiento previo.

No se observaron diferencias relevantes entre hombres y mujeres en cuanto a características basales.

Tabla 13. Características basales de los pacientes incluidos en el estudio.

Parámetro		n (%)
<b>Pacientes</b>		
	Hombres	81 (59,1%)
	Mujeres	56 (40,9%)
	Total	137 (100%)
<b>Edad (años) mediana (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>		
	Hombres	71 (58-77)
	Mujeres	70 (60-76)
	Total	70 (60-77)
<b>ECOG PS</b>		
	Hombres	
	0	45 (55,6%)
	1	31 (38,3%)
	>1	5 (6,2%)
	Mujeres	
	0	37 (66,1%)
	1	17 (30,4%)
	>1	2 (3,6%)
	Total	
	0	82 (59,9%)
	1	48 (35%)
	>1	7 (5,1%)

Tipo de cáncer			
	Hombres	Colon	54 (66,7%)
		Recto	27 (33,3%)
	Mujeres	Colon	37 (66,1%)
		Recto	19 (33,9%)
	Total	Colon	91 (66,4%)
		Recto	46 (33,6%)
Tiempo de evolución (años) mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> )			
	Hombres		4 (2-5)
	Mujeres		4 (3-5)
	Total		4 (3-5)
Grado del tumor			
	Hombres	I	1 (1,2%)
		II	11 (13,6%)
		III	21 (25,9%)
		IV	48 (59,3%)
	Mujeres	I	0 (0%)
		II	10 (17,9%)
		III	19 (33,9%)
		IV	27 (48,2%)
	Total	I	1 (0,7%)
		II	21 (15,3%)
		III	40 (29,2%)
		IV	75 (54,7%)
Tratamiento previo			
	Hombres	Sin tratamiento previo	27 (33,3%)
		Cirugía	47 (58%)
		Radioterapia	1 (1,2%)
		Cirugía + radioterapia	6 (7,4%)
	Mujeres	Sin tratamiento previo	14 (25%)
		Cirugía	36 (64,3%)
		Radioterapia	0 (0%)
		Cirugía + radioterapia	6 (10,7%)
	Total	Sin tratamiento previo	41 (29,9%)
		Cirugía	83 (60,6%)
		Radioterapia	1 (0,7%)
		Cirugía + radioterapia	12 (8,8%)

ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group performance status.

#### 4.2.- Frecuencias genotípicas de polimorfismos potencialmente relevantes en farmacogenética del CCR

En la Tabla 14 se muestran las frecuencias genotípicas observadas y las proporcionadas por HapMap en población caucásica para cada uno de los polimorfismos analizados en el estudio. En esta tabla se puede observar la gran similitud que existe entre las frecuencias para los distintos genotipos encontradas en la población de pacientes que participaron en este estudio y las recogidas en el estudio HapMap, excepto en el caso de los polimorfismos *TYMS* 6del y *ABCB1* C3435T. La proporción de pacientes con el genotipo heterocigoto del/WT para el polimorfismo *TYMS* 6del fue superior al resto de genotipos, tanto en la población del presente trabajo como en la población HapMap CEU (49,6 y 48,4%, respectivamente). Sin embargo, la frecuencia del genotipo homocigoto salvaje WT/WT fue mayor a la frecuencia obtenida para el genotipo con la delección en homocigosis del/del en la población de este estudio (38,7% vs. 11,7%, respectivamente), mientras que en la población HapMap se encontró lo contrario (16,1% vs. 35,5%, respectivamente). En cuanto a la variante *ABCB1* C3435T, también fue el genotipo heterocigoto CT el mayoritario en ambas poblaciones de estudio (54,7% en los pacientes del presente estudio y 55,8% en la población HapMap). El genotipo homocigoto para el alelo C, sin embargo, fue más frecuente que el genotipo homocigoto para el alelo T en este estudio (27% vs. 18,2%) que en la población HapMap (15% vs. 29,2%).

El equilibrio de Hardy-Weinberg se cumplió en todos los polimorfismos en los que es aplicable ( $p > 0,05$ ), excepto en *UGT1A1*\*93 ( $p = 0,026$ ) y *ERCC2* Lys751Gln ( $p = 0,037$ ). Pese a ello, puede observarse que las frecuencias genotípicas observadas para estas dos variantes son prácticamente iguales a las frecuencias mostradas en HapMap (Tabla 14).



Tabla 14. Frecuencias genotípicas/alélicas para los polimorfismos analizados. Se resaltan en rojo aquellos valores de p Hardy-Weinberg estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

Identificación de SNP	Genotipos/Alelos	Frecuencia población estudio	Hardy-Weinberg p	Frecuencias HapMap CEU
TYMS				
VNTR	1R	0,35%	NA	0% <sup>1</sup>
	2R	43,5%		44,6%
	3R	56,2%		55,4%
	4R	0%		0%
USF E-box	2 sitios USF E-box	54,7%	NA	NA
	3 sitios USF E-box	36,5%		
	4 sitios USF E-box	8,8%		
6del	WT/WT	38,7%	0,407	16,1% <sup>1</sup>
	del/WT	49,6%		48,4%
	del/del	11,7%		35,5%
DPYD				
A496G	AA	85,4%	0,814	85,7%
	GA	13,9%		14,3%
	GG	0,7%		0%
MTHFR				
A1298C	AA	46,7%	0,451	43,4%
	CA	45,3%		45,1%
	CC	8%		11,5%
C677T	CC	49,6%	0,261	46,9%
	CT	38,7%		44,2%
	TT	11,7%		8,8%
UGT1A1				
UGT1A1*28	5	0,35%	NA	0% <sup>2</sup>
	6	71,2%		77,2%
	7	28,1%		22,6%
	8	0%		0,2%
UGT1A1*93	GG	54,7%	0,026	51,7%
	GA	43,1%		43,3%
	AA	2,2%		5%
XRCC1				
Gln399Arg	AA	16,8%	0,298	11,6%
	GA	43,1%		50%
	GG	40,1%		38,4%
ERCC1				
Asn118Asn	TT	35,8%	0,808	37,2%
	CT	48,9%		54%
	CC	15,3%		8,8%
ERCC2				
Lys751Gln	AA	40,1%	0,037	40,7%
	CA	52,6%		52,2%
	CC	7,3%		7,1%

EGFR					
intrón 1 (CA) <sub>n</sub>	14 R	0%	NA	1,8% <sup>3</sup>	
	15 R	4,4%		1,7%	
	16 R	47,1%		40,5%	
	17 R	5,1%		7,2%	
	18 R	12,8%		19,3%	
	19 R	2,2%		2,4%	
	20 R	20,8%		20,6%	
	21 R	6,6%		5,9%	
	22 R	0%		0,5%	
	23 R	1,1%		0,1%	
	1/2 alelos ≥ 20 R	47,4%		NA	NA
	0 alelos ≥ 20R	52,6%			
ABCB1					
C1236T	CC	27,7%	0,623	26,5%	
	CT	51,8%		56,6%	
	TT	20,4%		16,8%	
G2677T/A	GG	35%	0,794	25,7%	
	GT	45,3%		54,9 %	
	GA	3,6%		-	
	TT	16,1%		19,5%	
C3435T	CC	27%	0,226	15%	
	CT	54,7%		55,8%	
	TT	18,2%		29,2%	
ABCC4					
T38G	TT	29,2%	0,845	28,3%	
	TG	48,9%		48,7%	
	GG	21,9%		23%	
A311G	AA	23,4%	0,266	28,6%	
	GA	54,7%		48,2%	
	GG	21,9%		23,2%	
ABCC5					
A1366C	AA	83,2%	0,956	88,3%	
	AC	16,1%		11,7%	
	CC	0,7%		0%	
CDA					
Lys27Gln	AA	50,4%	0,128	44,2%	
	AC	37,2%		45,1%	
	CC	12,4%		10,6%	
GSTP1					
Ile105Val	AA	39,4%	0,092	31,9%	
	GA	51,8%		54,9%	
	GG	8,8%		13,3%	
GSTT1					
CNV	0 copias	8%	NA	NA	
	1 copia	2,2%			
	2 copias	89,8%			

NA, no aplica; <sup>1</sup>Frecuencias HapMap CAUC1; <sup>2</sup>Frecuencias PA142177574; <sup>3</sup>Frecuencias PA137981823.

El análisis de haplotipos muestra la existencia de LD entre todos los SNPs estudiados que están en el mismo gen: *ABCB1* C1236T – G2677T/A, *ABCB1* C1236T – C3435T, *ABCB1* G2677T/A – C3435T, *MTHFR* C677T – A1298C, *ABCC4* T38G – A311G, *TYMS* VNTR – 6del y *UGT1A1*\*28 – \*93 (Tabla 15).

Tabla 15. Estudio de desequilibrio de ligamiento entre polimorfismos.

Gen	Bloques haplotípicos	LD	
		D'	r <sup>2</sup>
<i>ABCB1</i>	1236 (T) – 2677 (T/A)	0,91	0,66
	1236 (T) – 3435 (T)	0,73	0,52
	2677 (T/A) – 3435 (T)	0,82	0,54
<i>MTHFR</i>	677 (C) – 1298 (C)	0,94	0,18
<i>ABCC4</i>	38 (G) – 311 (G)	0,99	0,86
<i>TYMS</i>	VNTR (2R) – 6del (WT)	0,65	0,19
<i>UGT1A1</i>	*28 (6) – *93 (G)	0,98	0,78

LD, desequilibrio de ligamiento.

#### 4.3.- Revisión de la farmacogenética de las reacciones adversas al tratamiento quimioterápico en pacientes de CCR

Se revisó exhaustivamente la literatura sobre variaciones en el genoma de pacientes de CCR y su asociación con el riesgo de sufrir reacciones adversas severas como consecuencia del tratamiento quimioterápico. Los resultados de dicha revisión, que fue publicada en la revista *Pharmacogenomics*<sup>173</sup> (Anexo 3) están comentados en las diferentes secciones, pero los aspectos más significativos se pueden resumir en tres apartados:

1. Sólo las fichas técnicas de tres fármacos utilizados en CCR (5-FU, capecitabina e irinotecan) recomiendan la determinación de biomarcadores farmacogenéticos antes de prescribirlos para evitar o disminuir la toxicidad asociada. El genotipado de *DPYD* podría ser útil en la estratificación de pacientes según el riesgo de toxicidad o en el establecimiento de recomendaciones de dosis para 5-FU, capecitabina y tegafur. De la misma manera, la identificación de pacientes de CCR portadores del alelo *UGT1A1\*28* podría contribuir a reducir la toxicidad severa inducida por irinotecan, especialmente en las situaciones en que se administren altas dosis de este fármaco.
2. En los últimos diez años se han llevado a cabo múltiples estudios acerca de la farmacogenética de los efectos adversos a la quimioterapia en pacientes de CCR. Sin embargo, los resultados obtenidos no son concluyentes en la mayoría de los casos, lo que se debe fundamentalmente a la heterogeneidad en cuanto al diseño de los estudios. Así, polimorfismos en *TYMS* y *MTHFR* no se consideran biomarcadores válidos para predecir toxicidad frente a fluoropirimidinas, aunque la combinación de ambos genotipos podría ser un biomarcador prometedor. Tampoco se recomienda para predecir toxicidad frente a oxaliplatino, a causa de la falta de evidencia, el genotipado de polimorfismos en genes implicados en la ruta metabólica de oxaliplatino ni en genes de los sistemas de reparación del ADN.
3. Finalmente, los GWAS son una excelente herramienta para la identificación de biomarcadores que predigan la toxicidad inducida por los agentes quimioterápicos utilizados en CCR. Este abordaje experimental proporcionará probablemente información muy interesante en los próximos años.

#### 4.4.- Identificación de polimorfismos genéticos asociados a reacciones adversas al tratamiento con regímenes quimioterápicos que contienen 5-FU en pacientes de CCR

##### 4.4.1.- Características basales de los pacientes

En este estudio se incorporaron 67 pacientes en tratamiento con esquemas basados en 5-FU. Las características basales de esta subpoblación (Tabla 16) fueron muy similares a las de la población general de 137 pacientes (Tabla 13). Puede observarse que el fármaco asociado a 5-FU más frecuentemente fue oxaliplatino (77,6%), dentro del esquema FOLFOX. Un alto porcentaje de los pacientes padecían CCR en estadio IV (71,6%), por lo que un 38,8% de ellos recibió además bevacizumab.

Tabla 16. Características basales de los pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en 5-FU.

Parámetro	n (%)	
Pacientes		
	Hombres	35 (52,2%)
	Mujeres	32 (47,8%)
	Total	67 (100%)
Edad (años) mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> )		65 (53-75)
ECOG PS		
	0	38 (56,7%)
	1	27 (40,3%)
	>1	2 (3%)
Tipo de cáncer		
	Colon	42 (62,7%)
	Recto	25 (37,3%)
Tiempo de evolución (años) mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> )		4 (3-5)
Grado del tumor		
	II	5 (7,5%)
	III	14 (20,9%)
	IV	48 (71,6%)
Tratamiento previo		
	Sin tratamiento previo	19 (28,4%)
	Cirugía	41 (61,2%)
	Cirugía + Radioterapia	7 (10,4%)
Otros fármacos		
	Oxaliplatino	52 (77,6%)
	Bevacizumab	26 (38,8%)
	Irinotecan	12 (17,9%)
	Cetuximab	8 (11,9%)

ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group performance status.

#### 4.4.2.- Polimorfismos analizados

Para este análisis se estudiaron variantes de genes que afectan al metabolismo o al transporte de fluoropirimidinas, o que son dianas de las mismas. En la Tabla 17 se detallan los polimorfismos estudiados y los genes a los que corresponden. Además de los SNPs de genes que participan en la farmacocinética o dinámica de fluoropirimidinas (*DPYD*, *TYMS*, *MTHFR*, *ABCC4*, *ABCC5* y *CDA*), se decidió analizar, tanto en este estudio como en el correspondiente a capecitabina, tres SNPs del gen *ABCB1*. Aunque no se ha descrito previamente ninguna asociación entre estos polimorfismos y toxicidad a fluoropirimidinas, sí que se ha reportado que estos polimorfismos podrían ser marcadores predictores de respuesta en pacientes de CCR tratados con 5-FU<sup>174</sup>. Esta observación sugiere que también podrían estar implicados en la toxicidad a fluoropirimidinas.

Tabla 17. Polimorfismos analizados en pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en 5-FU o capecitabina.

Gen	Polimorfismo	
	Identificación rs (dbSNP)	Identificación en el texto de esta memoria
<b><i>DPYD</i></b>	rs2297595	<i>DPYD</i> A496G
<b><i>TYMS</i></b>	rs34489327	<i>TYMS</i> 6del
	rs34743033	<i>TYMS</i> USF E-box
<b><i>MTHFR</i></b>	rs1801133	<i>MTHFR</i> C677T
	rs1801131	<i>MTHFR</i> A1298C
<b><i>ABCC4</i></b>	rs4148551	<i>ABCC4</i> A311G
	rs3742106	<i>ABCC4</i> T38G
<b><i>ABCC5</i></b>	rs3805114	<i>ABCC5</i> A1366C
<b><i>CDA</i></b>	rs2072671	<i>CDA</i> Lys27Gln
<b><i>ABCB1</i></b>	rs1128503	<i>ABCB1</i> C1236T
	rs2032582	<i>ABCB1</i> G2677T/A
	rs1045642	<i>ABCB1</i> C3435T

dbSNP, Single Nucleotide Polymorphism database.

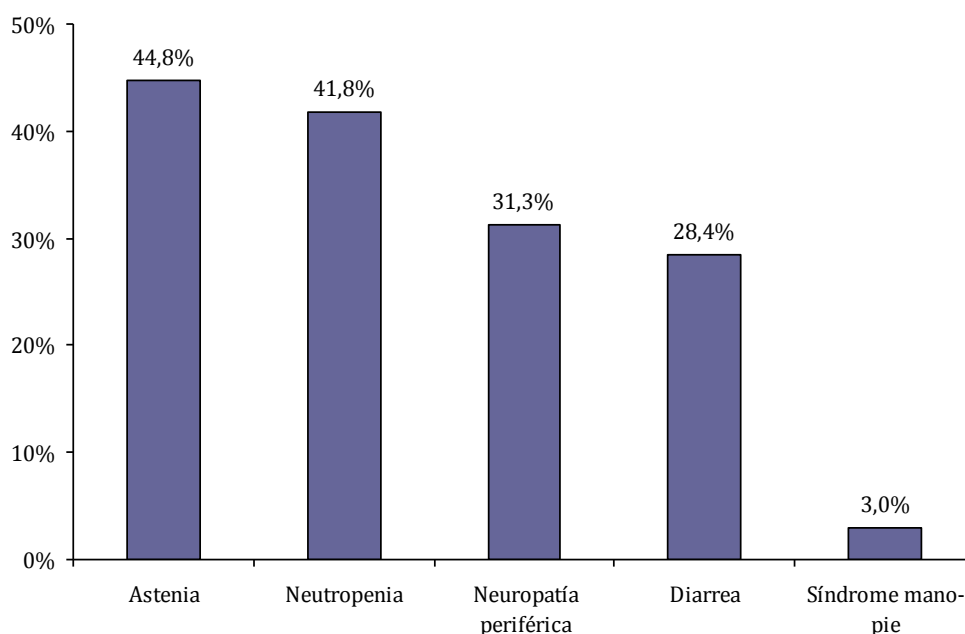
#### 4.4.3.- Reacciones adversas moderadas-severas a 5-FU. Análisis estadístico

En la mayoría de los trabajos que existen en la literatura, una toxicidad se considera severa a partir del grado 3. En el presente trabajo, además de estudiar la toxicidad severa, se decidió estudiar la toxicidad moderada-severa por dos motivos. Por un lado, es frecuente en la práctica clínica que la aparición de una reacción adversa grado 2 persistente, o varias toxicidades grado 2, sea motivo de reducción de dosis o de cambio de tratamiento, no

alcanzándose de esta manera el grado 3 de toxicidad que de lo contrario se habría conseguido. Por otro lado, dado el reducido número de pacientes incorporados al estudio, 67, y la menor proporción de pacientes que desarrollan efectos adversos grado  $\geq 3$  que grado  $\geq 2$ , es más probable obtener asociaciones estadísticamente significativas si se aumenta el número de pacientes incluidos en el grupo que desarrolla toxicidad. En función de la severidad del efecto adverso observado se hicieron dos grupos: pacientes con toxicidad moderada-severa (grado  $\geq 2$ ) y pacientes con baja o nula toxicidad (grados 0 y 1).

Las reacciones adversas moderadas-severas más comunes fueron astenia (44,8%), neutropenia (41,8%), neuropatía periférica (31,3%) y diarrea (28,4%), mientras que una baja proporción de los pacientes desarrolló SMP a lo largo de su tratamiento, ya que esta reacción adversa es más frecuente en tratamientos basados en capecitabina (Figura 22). Con respecto al resto de reacciones adversas analizadas [náuseas y vómitos, mucositis, anorexia, anemia, plaquetopenia, leucopenia, reacción cutánea acneiforme (RCA), reacción alérgica y toxicidad hepática], no hubo ningún paciente que desarrollara toxicidad grado  $\geq 2$ . Un 56,7% de los pacientes tratados con esquemas que contenían 5-FU sufrieron retrasos en las administraciones o reducciones de dosis por aparición de toxicidad a lo largo del tratamiento.

Figura 22. Reacciones adversas moderadas-severas (grado  $\geq 2$ ) desarrolladas por los pacientes tratados con regímenes basados en 5-FU.



Mediante tablas de contingencia y el test exacto de Fisher, se estudió la relación entre los efectos adversos moderados-severos observados y los genotipos de los pacientes para los SNPs estudiados. En la Tabla 18 se indican los valores de p obtenidos. Retrasos en la administración del tratamiento o reducciones de dosis del mismo, ambos motivados únicamente por toxicidad, se consideraron una reacción adversa más al tratamiento.

Tabla 18. Valores de p para las asociaciones entre los polimorfismos estudiados y reacciones adversas moderadas-severas (grado  $\geq 2$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos que contienen 5-FU. Se resaltan en rojo aquellos valores de p estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

	Diarrea	Neutropenia	Neuropatía	SMP	Astenia	Retraso/ reducción
<i>DPYD</i> A496G	1	0,543	1	1	0,525	0,75
<i>TYMS</i> 6del	0,18	0,485	<b>0,024</b>	0,633	0,863	0,863
<i>TYMS</i> USF E-box	0,543	0,453	0,845	0,593	0,71	0,714
<i>MTHFR</i> C677T	0,425	0,715	0,568	0,346	1	0,468
<i>MTHFR</i> A1298C	1	0,066	0,846	1	0,717	0,716
<i>ABCC4</i> A311G	1	0,863	0,359	0,63	0,23	0,864
<i>ABCC4</i> T38G	1	0,744	0,164	0,655	0,144	0,871
<i>ABCC5</i> A1366C	1	0,533	0,203	1	0,121	0,059
<i>CDA</i> Lys27Gln	1	0,133	0,602	0,412	0,511	0,62
<i>ABCB1</i> C1236T	0,19	0,301	0,582	1	0,607	0,734
<i>ABCB1</i> G2677T/A	0,353	0,312	0,471	1	0,24	0,613
<i>ABCB1</i> C3435T	<b>0,037</b>	0,734	0,275	1	1	0,609

SMP, síndrome mano-pie.

Se obtuvieron asociaciones estadísticamente significativas entre *TYMS* 6del y la aparición de neuropatía periférica moderada-severa ( $p = 0,024$ ) y *ABCB1* C3435T y diarrea moderada-severa ( $p = 0,037$ ). Para neutropenia, SMP, astenia y retraso o reducción de dosis no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa.

La tabla de contingencia (Tabla 19) recoge esas asociaciones estadísticamente significativas halladas, así como las frecuencias genotípicas observadas para cada grupo de pacientes clasificados por el grado de toxicidad de la reacción adversa.



Tabla 19. Tablas de contingencia con las asociaciones estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre polimorfismos y reacciones adversas moderadas-severas (grado  $\geq 2$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en 5-FU.

Gen (identificación de SNP)	Genotipo	n (%)	Grado de toxicidad [n (%)]		p	Reacción adversa
			0-1	2-4		
<b><i>TYMS</i> (6del)</b>	WT/WT	28 (41,8%)	13 (46,4%)	15 (53,6%)	<b>0,024</b>	<b>Neuropatía periférica</b>
	del/WT	29 (43,3%)	26 (89,7%)	3 (10,3%)		
	del/del	10 (14,9%)	7 (70%)	3 (30%)		
<b><i>ABCB1</i> (C3435T)</b>	CC	21 (31,3%)	19 (90,5%)	2 (9,5%)	<b>0,037</b>	<b>Diarrea</b>
	CT	32 (47,8%)	21 (65,6%)	11 (34,4%)		
	TT	14 (20,9%)	8 (57,1%)	6 (42,9%)		

El análisis mostró que los pacientes que portaban la delección de 6 pb en el gen de la *TYMS*, tanto en homocigosis como en heterocigosis, tuvieron un menor riesgo de desarrollar neuropatía periférica (30% y 10,3%, respectivamente) que los que no la tenían (53,6%) (Tabla 19).

Igualmente, el polimorfismo *ABCB1* C3435T se asoció de forma estadísticamente significativa al desarrollo de diarrea en pacientes tratados con esquemas basados en 5-FU ( $p = 0,037$ ). Así, los pacientes homocigotos TT para este polimorfismo presentaron mayor probabilidad de desarrollar diarrea moderada-severa (42,9%) que los heterocigotos CT (34,4%) o los homocigotos para el genotipo salvaje CC (9,5%) (Tabla 19).

Además del polimorfismo C3435T en *ABCB1*, se analizaron otros dos en este mismo gen: G2677T/A y C1236T. Los resultados obtenidos en cuanto a las asociaciones entre los polimorfismos en *ABCB1* y diarrea moderada-severa se detallan en la Tabla 20, en la que se puede observar cómo únicamente el polimorfismo C3435T presenta porcentajes significativamente distintos en estos pacientes.

Tabla 20. Tablas de contingencia con las asociaciones entre los polimorfismos analizados en *ABCB1* y diarrea moderada-severa (grado  $\geq 2$ ) en la población tratada con 5-FU. Se resaltan en rojo aquellos valores de p estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

Genotipos	n (%)	Diarrea [n (%)]		p
		0-1	2-4	
ABCB1 C1236T				
CC	22 (32,8%)	19 (86,4%)	3 (13,6%)	0,190
CT	32 (47,8%)	20 (62,5%)	12 (37,5%)	
TT	13 (19,4%)	9 (69,2%)	4 (30,8%)	
ABCB1 G2667T/A				
GG	26 (38,8%)	21 (80,8%)	5 (19,2%)	0,353
GT/A	29 (43,3%)	19 (65,5%)	10 (34,5%)	
TT	12 (17,9%)	8 (66,7%)	4 (33,3%)	
ABCB1 C3435T				
CC	21 (31,3%)	19 (90,5%)	2 (9,5%)	0,037
CT	32 (47,8%)	21 (65,6%)	11 (34,4%)	
TT	14 (20,9%)	8 (57,1%)	6 (42,9%)	

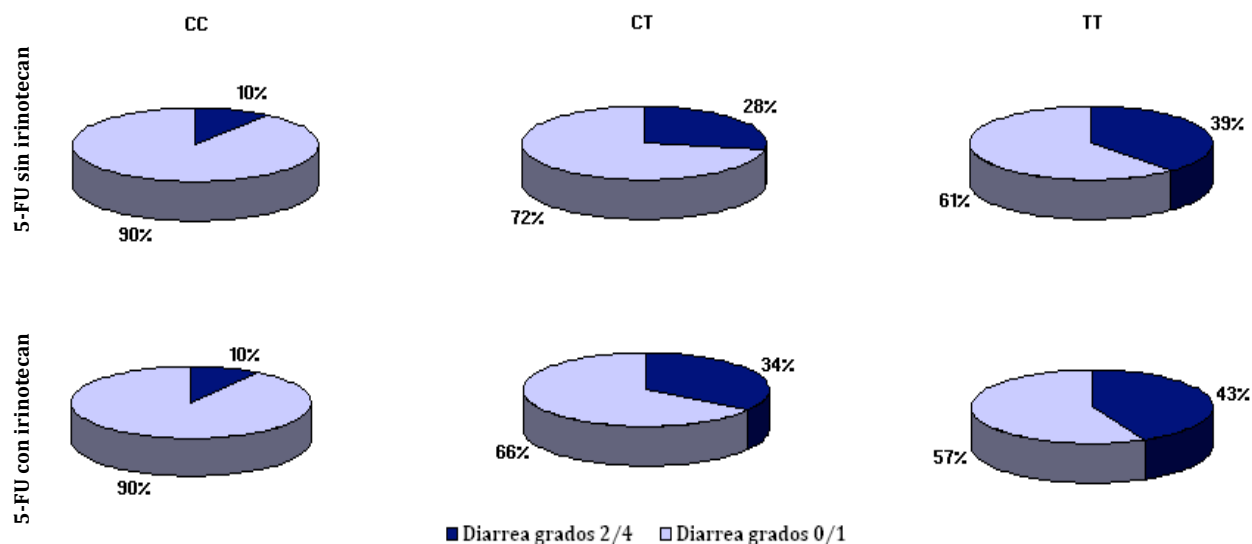
*ABCB1* participa en el transporte de irinotecan hacia el exterior celular<sup>175-177</sup>. Dado que un 17,9% de los pacientes incluidos en el estudio habían sido tratados con regímenes que contenían irinotecan, y con el fin de eliminar el posible efecto de este fármaco en esta asociación, se llevó a cabo un nuevo análisis excluyendo a los pacientes tratados con la combinación 5-FU e irinotecan. Los porcentajes de pacientes con diarrea moderada-severa en función del genotipo *ABCB1* C3435T se mantuvieron similares en aquéllos que recibieron 5-FU sin irinotecan (38,5% para los homocigotos mutantes TT, 27,6% para los heterocigotos y 10% para los homocigotos para el alelo salvaje) (Tablas 20 y 21). Sin embargo, la asociación obtenida no resultó estadísticamente significativa ( $p = 0,066$ ), probablemente debido al reducido número de pacientes.

Tabla 21. Tabla de contingencia con la asociación entre *ABCB1* C3435T y diarrea moderada-severa (grado  $\geq 2$ ) en pacientes tratados con regímenes basados en 5-FU excluyendo combinaciones con irinotecan.

Genotipos <i>ABCB1</i> C3435T	Tratamiento basado en 5-FU (excluido irinotecan)			p
	n (%)	Diarrea [n(%)]		
		0-1	2-4	
CC	20 (32,3%)	18 (90%)	2 (10%)	0,066
CT	29 (46,8%)	21 (72,4%)	8 (27,6%)	
TT	13 (21%)	8 (61,5%)	5 (38,5%)	

La asociación entre *ABCB1* C3435T y diarrea moderada-severa, tanto en la población general tratada con regímenes basados en 5-FU, como en el grupo en el que se excluyó irinotecan del análisis, se observa más claramente en la Figura 23.

Figura 23. Proporción de pacientes que desarrollaron diarrea moderada-severa (grado  $\geq 2$ ) en función del genotipo de *ABCB1* C3435T y la presencia o no de irinotecan en el régimen.



Las dos asociaciones estadísticamente significativas en el análisis univariante (neuropatía moderada-severa y *TYMS* 6del y diarrea moderada-severa y *ABCB1* C3435T) se confirmaron al analizar los datos mediante una regresión logística que incluía el sexo y el PS como covariables (Tabla 22).

Tabla 22. Regresión logística con las asociaciones que se mantuvieron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre polimorfismos y reacciones adversas moderadas-severas (grado  $\geq 2$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en 5-FU.

Variable	OR	95% IC	p
<b>Neuropatía moderada-severa</b>			
<b><i>TYMS</i> (6del)</b>			
WT/del vs. WT/WT	0,085	0,020 a 0,367	<b>0,001</b>
del/del o del/WT vs. WT/WT	0,147	0,046 a 0,474	<b>0,001</b>
<b>Diarrea moderada-severa</b>			
<b><i>ABCB1</i> (C3435T)</b>			
CC vs. TT	0,155	0,025 a 0,969	<b>0,046</b>
CC vs. CT	0,178	0,034 a 0,936	<b>0,042</b>
CC vs. CT/TT	0,170	0,034 a 0,842	<b>0,030</b>

OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza.

Los pacientes homocigotos y heterocigotos para la delección de 6 pb en el gen *TYMS* (del/del y del/WT) mostraron una menor probabilidad de sufrir neuropatía moderada-severa que los pacientes homocigotos salvajes (WT/WT) (OR: 0,147; IC 95%: 0,046-0,474;  $p = 0,001$ ) (Tabla 22). La comparación de sólo los pacientes heterocigotos frente a los homocigotos salvajes reflejó un menor riesgo de los primeros de sufrir neuropatía moderada-severa frente a los segundos (OR: 0,085; IC 95%: 0,02-0,367;  $p = 0,001$ ).

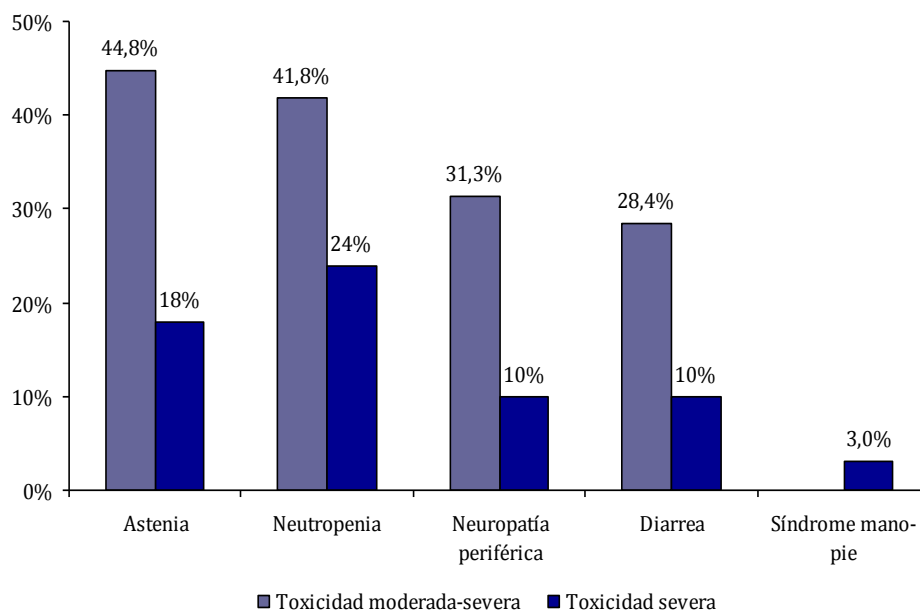
En cuanto a la asociación entre diarrea moderada-severa y *ABCB1* C3435T, este análisis multivariante mostró cómo los pacientes homocigotos para el alelo C tuvieron un menor riesgo de desarrollar diarrea a lo largo del tratamiento que los homocigotos para el alelo T (OR: 0,155; IC 95%: 0,025-0,969;  $p = 0,046$ ) y que los pacientes heterocigotos CT (OR: 0,178; IC 95%: 0,034-0,936;  $p = 0,042$ ) (Tabla 22). Los individuos portadores del alelo C en homocigosis también mostraron un riesgo menor de padecer diarrea moderada-severa (OR: 0,170; IC 95%: 0,034-0,842;  $p = 0,03$ ) cuando se compararon con el resto.

#### 4.4.4.- Reacciones adversas severas a 5-FU. Análisis estadístico

Se llevó a cabo también un análisis estadístico de los datos considerando los siguientes grupos de pacientes en función de la toxicidad: toxicidad severa (grados 3 y 4) y no toxicidad (grado  $\leq 2$ ), puesto que una gran parte de los estudios publicados se realizan de esta forma. Como era de esperar, los porcentajes de pacientes que presentaron efectos adversos severos fueron sensiblemente menores que los que presentaron efectos adversos moderados-severos (Figura 24).

La reacción adversa severa más frecuente fue neutropenia (24%), seguida de astenia (18%), diarrea y neuropatía periférica (10% en ambos casos).

Figura 24. Reacciones adversas moderadas-severas (grado  $\geq 2$ ) y severas (grado  $\geq 3$ ) desarrolladas por los pacientes tratados con regímenes basados en 5-FU. Se consideró síndrome mano-pie severo cuando el grado fue  $\geq 2$ .



El análisis de asociación de genotipos con los efectos adversos severos más frecuentes, llevado a cabo mediante el test  $\chi^2$  y el estadístico exacto de Fisher, reveló tres asociaciones estadísticamente significativas: *TYMS* 6del con neuropatía periférica, y *TYMS* USF E-box y *CDA* Lys27Gln con neutropenia (Tabla 23).

Tabla 23. Valores de p para las asociaciones entre los polimorfismos estudiados y reacciones adversas severas (grado  $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos que contienen 5-FU. Se resaltan en rojo aquellos valores de p estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

	Diarrea	Neutropenia	Neuropatía	Astenia	Retraso/reducción
<i>DPYD</i> A496G	1	1	1	0,105	0,75
<i>TYMS</i> 6del	0,275	0,159	<b>0,003</b>	0,178	0,863
<i>TYMS</i> USF E-box	0,547	<b>0,014</b>	0,126	1	0,714
<i>MTHFR</i> C677T	0,572	0,537	0,572	1	0,468
<i>MTHFR</i> A1298C	1	0,528	1	0,64	0,716
<i>ABCC4</i> A311G	1	0,842	0,783	1	0,864
<i>ABCC4</i> T38G	1	0,71	0,601	0,835	0,871
<i>ABCC5</i> A1366C	0,614	1	0,33	0,104	0,059
<i>CDA</i> Lys27Gln	0,608	<b>0,032</b>	0,297	0,282	0,62
<i>ABCB1</i> C1236T	0,161	0,318	0,593	0,658	0,734
<i>ABCB1</i> G2677T/A	0,274	0,172	1	0,664	0,613
<i>ABCB1</i> C3435T	0,411	0,429	1	0,512	0,609

Al comparar estos resultados con los obtenidos en el análisis de toxicidad moderada-severa, se puede observar cómo se mantuvo la asociación entre *TYMS* 6del y neuropatía periférica ( $p = 0,003$ ). Además, se obtuvieron otras dos asociaciones estadísticamente significativas que no se encontraron en el estudio previo: *TYMS* USF E-box y *CDA* Lys27Gln con neutropenia severa ( $p = 0,014$  y  $0,032$ , respectivamente). En este caso no se incluyó en el estudio el efecto adverso SMP, ya que se gradúa de manera diferente (de 0 a 3) al resto de efectos adversos (de 0 a 5); así, un SMP grado 2 se considera ya severo.

Tabla 24. Tablas de contingencia con las asociaciones estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre polimorfismos y reacciones adversas severas (grado  $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en 5-FU.

Gen (identificación de SNP)	Genotipo	n (%)	Grado de toxicidad [n(%)]		p	Reacción adversa
			0-2	3-4		
<b><i>TYMS</i> (6del)</b>	WT/WT	28 (41,8%)	21 (75%)	7 (25%)	<b>0,003</b>	<b>Neuropatía periférica</b>
	del/WT	29 (43,3%)	29 (100%)	0 (0%)		
	del/del	10 (14,9%)	10 (100%)	0 (0%)		
<b><i>TYMS</i> (USF E-box)</b>	2 sitios USF E-box	36 (53,7%)	23 (63,9%)	13 (36,1%)	<b>0,014</b>	<b>Neutropenia</b>
	3 sitios USF E-box	25 (37,3%)	22 (88%)	3 (12%)		
	4 sitios USF E-box	6 (9%)	6 (100%)	0 (0%)		
<b><i>CDA</i> (Lys27Gln)</b>	AA	37 (55%)	25 (67,6%)	12 (32,4%)	<b>0,032</b>	<b>Neutropenia</b>
	AC	20 (30%)	16 (80%)	4 (20%)		
	CC	10 (15%)	10 (100%)	0 (0%)		

*TYMS* USF E-box se asoció con neutropenia, de tal manera que ninguno de los pacientes con 4 secuencias E-box de unión del USF-1 en la repetición de 28 pb en la región *enhancer* del gen desarrolló neutropenia severa frente al 12% y al 36,1% de pacientes que sí lo hicieron y que eran portadores de 3 y 2 sitios E-box, respectivamente (Tabla 24). Esta tendencia a presentar mayor riesgo de neutropenia en pacientes con un menor número de secuencias E-box también se obtuvo al analizar neutropenia moderada-severa (44,4% en pacientes con 2 sitios de unión, 44% en pacientes con 3 puntos de unión y 16,7% en el caso de portadores de 4 puntos de unión), aunque la asociación no alcanzó significación estadística ( $p = 0,453$ ).

En comparación con los heterocigotos AC (20%) y los homocigotos AA (32,4%), ninguno de los pacientes homocigotos CC para el polimorfismo Lys27Gln en *CDA* desarrolló neutropenia severa (Tabla 24). Al analizar neutropenia moderada-severa también se observó esta tendencia (48,6% en pacientes homocigotos para el alelo A, 40% en pacientes heterocigotos AC y 20% en pacientes homocigotos para el alelo C), pero no se obtuvo significación estadística ( $p = 0,133$ ).

Se realizó un análisis por regresión logística de las tres asociaciones que resultaron estadísticamente significativas por el estadístico de Fisher (Tabla 25). En este caso sólo la asociación entre *TYMS* USF E-box y neutropenia severa se mantuvo estadísticamente significativa cuando se añadieron como covariables el sexo y el PS de los pacientes. Así, los pacientes con 3 secuencias E-box presentaron una menor probabilidad de desarrollar neutropenia severa que los portadores de 2 sitios E-box (OR: 0,227; IC 95%: 0,056-0,925;  $p = 0,039$ ). Al analizar conjuntamente los portadores de 3 ó 4 secuencias E-box en el gen *TYMS* frente a los portadores de tan solo 2 secuencias E-box se encontró una disminución del riesgo de sufrir neutropenia severa en los primeros (OR: 0,184; IC 95%: 0,046-0,732;  $p = 0,016$ ).

Tabla 25. Regresión logística con las asociaciones que se mantuvieron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre polimorfismos y reacciones adversas severas (grado  $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en 5-FU.

Variable	OR	95% IC	p
<b>Neutropenia severa</b>			
<b><i>TYMS</i> (USF E-box)</b>			
3 copias vs. 2	0,227	0,056 a 0,925	<b>0,039</b>
3/4 copias vs. 2	0,184	0,046 a 0,732	<b>0,016</b>

OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confianza.

Tal y como se ha indicado en la sección introductoria, la neuropatía periférica es el efecto adverso más característico del tratamiento con oxaliplatino. Con el objetivo de verificar que la asociación obtenida entre *TYMS* 6del y neuropatía, tanto moderada-severa como severa, no estaba siendo distorsionada por este fármaco asociado a 5-FU en la mayoría de estos pacientes (77,6%) se llevó a cabo un análisis por regresión logística, que incluyó como covariable el hecho de que el tratamiento fuera o no una combinación que contuviera

oxaliplatino. Como se observa en la Tabla 26, la asociación entre oxaliplatino con neuropatía moderada-severa no resultó estadísticamente significativa ( $p = 0,968$ ), pero sí se mantuvo la asociación entre *TYMS* 6del y el efecto adverso ( $p = 0,001$ ). En cuanto a la neuropatía severa, ni la presencia de oxaliplatino ni el polimorfismo en *TYMS* resultaron estar asociados con la aparición del efecto adverso.

Tabla 26. Regresión logística incluyendo la presencia de oxaliplatino en el esquema basado en 5-FU y *TYMS* 6del como covariables en cuanto a la aparición de neuropatía moderada-severa (grado  $\geq 2$ ) y severa (grado  $\geq 3$ ). Se resaltan en rojo aquellos valores de  $p$  estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

Variable	OR	95% IC	p
<b>Neuropatía moderada-severa</b>			
<i>TYMS</i> (6del): WT/del vs. WT/WT	0,1	0,024 a 0,409	<b>0,001</b>
Oxaliplatino	0,973	0,256 a 3,698	0,968
<b>Neuropatía severa</b>			
<i>TYMS</i> (6del): WT/del vs. WT/WT	NA	NA	0,998
Oxaliplatino	1,875	0,180 a 19,525	0,599

OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confianza; NA, no aplica.



#### **4.5.- Identificación de polimorfismos genéticos asociados a reacciones adversas al tratamiento con regímenes quimioterápicos que contienen capecitabina en pacientes de CCR**

##### **4.5.1.- Características basales de los pacientes**

En este estudio se incorporaron 74 pacientes tratados con esquemas basados en capecitabina. Las tendencias en cuanto a características basales de todos los pacientes incluidos en el trabajo también se mantienen en este caso (Tablas 27 y 13). El fármaco que se asoció con más frecuencia a capecitabina fue, al igual que en caso de 5-FU, oxaliplatino (54%). Sin embargo, irinotecan se asoció más a capecitabina (32,4%) que a 5-FU (17,9%) (Tablas 16 y 27). Un importante porcentaje de pacientes (58,1%) padecía CCR en estadio IV de la enfermedad, por lo que un 39,2% de ellos recibió además bevacizumab asociado al tratamiento. Los datos entre capecitabina y 5-FU serán constantemente comparados a continuación, ya que la gran mayoría de tratamientos contienen una fluoropirimidina, normalmente 5-FU o capecitabina.

##### **4.5.2.- Polimorfismos analizados**

Los polimorfismos analizados en este segundo estudio coinciden con los seleccionados en la población tratada con 5-FU, al compartir ambas fluoropirimidinas prácticamente la misma ruta metabólica (Tabla 17 y Figura 5).

Tabla 27. Características basales de los pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina.

Parámetro	n (%)	
Pacientes		
	Hombres	44 (59,5%)
	Mujeres	30 (40,5%)
	Total	74 (100%)
Edad (años) mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> )		74 (64-77)
ECOG PS		
	0	45 (60,8%)
	1	24 (32,4%)
	>1	5 (6,8%)
Tipo de cáncer		
	Colon	53 (71,6%)
	Recto	21 (28,4%)
Tiempo de evolución (años) mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> )		4 (3-5)
Grado del tumor		
	II	14 (18,9%)
	III	17 (23%)
	IV	43 (58,1%)
Tratamiento previo		
	Sin tratamiento previo	21 (28,4%)
	Cirugía	46 (62,2%)
	Radioterapia	1 (1,4%)
	Cirugía + Radioterapia	6 (8,1%)
Otros fármacos		
	Oxaliplatino	40 (54%)
	Bevacizumab	29 (39,2%)
	Irinotecan	24 (32,4%)
	Cetuximab	1 (1,4%)

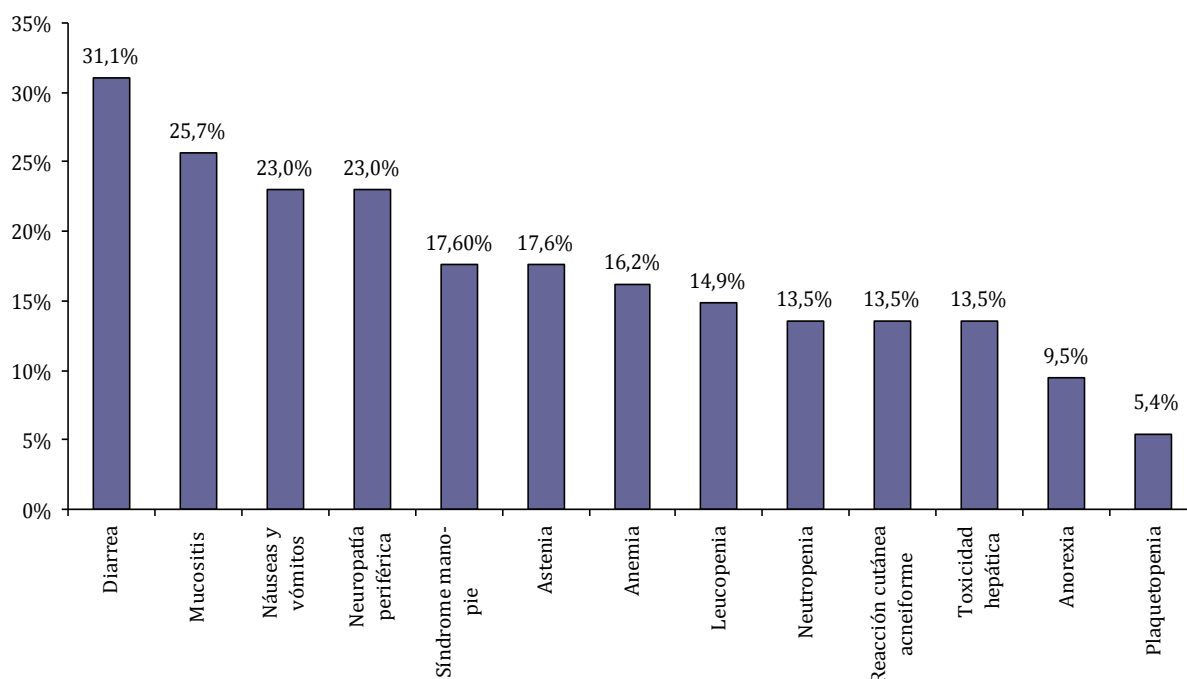
ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group performance status.

#### 4.5.3.- Reacciones adversas moderadas-severas a capecitabina. Análisis estadístico

En la Figura 25 se muestran los efectos adversos moderados-severos desarrollados por los pacientes tratados con un régimen basado en capecitabina. Las reacciones adversas más comunes al tratamiento basado en capecitabina fueron diarrea (31,1%), mucositis (25,7%), neuropatía periférica y náuseas y vómitos (23% en ambos casos), y SMP y astenia (17,6% en ambos casos). Ningún paciente desarrolló reacción alérgica > 1 durante el tratamiento

con capecitabina y a un 63,5% de estos pacientes se les retrasó algún ciclo o se les redujo la dosis de la quimioterapia a lo largo de su tratamiento.

Figura 25. Reacciones adversas moderadas-severas (grado  $\geq 2$ ) desarrolladas por los pacientes tratados con regímenes basados en capecitabina.



Al comparar las toxicidades observadas por tratamientos que contienen 5-FU o capecitabina se observan diferencias (Tabla 28). Las mayores diferencias se observan en neutropenia, SMP y astenia. Una mayor proporción de pacientes tratados con capecitabina desarrolló, como era de esperar, SMP moderado-severo (17,6%) a lo largo del tratamiento en comparación con los pacientes que recibieron 5-FU (3%). Sin embargo, neutropenia y astenia fueron menos frecuentes en la población que recibió capecitabina (13,5% y 17,6%, respectivamente) que en la que recibió 5-FU (41,8% y 44,8%, respectivamente).

Tabla 28. Comparación del perfil de toxicidad en la población de pacientes que recibieron regímenes basados en 5-FU y capecitabina en cuanto a las reacciones adversas moderadas-severas (grado  $\geq 2$ ) más frecuentes.

Reacción adversa grado 2-4	5-FU [n (%)]	Capecitabina [n (%)]
<b>Diarrea</b>	19 (28,4%)	23 (31,1%)
<b>Neutropenia</b>	28 (41,8%)	10 (13,5%)
<b>Neuropatía</b>	21 (31,3%)	17 (23%)
<b>SMP</b>	2 (3%)	13 (17,6%)
<b>Astenia</b>	30 (44,8%)	13 (17,6%)

SMP, síndrome mano-pie.

Se estudiaron las asociaciones entre los polimorfismos genotipados y los efectos adversos moderados-severos al tratamiento basado en capecitabina. En la Tabla 29 se muestran los valores de p obtenidos mediante el estadístico exacto de Fisher.

Se obtuvieron trece asociaciones estadísticamente significativas: *DPYD* A496G con neutropenia ( $p = 0,029$ ), náuseas y vómitos ( $p = 0,022$ ), y leucopenia moderadas-severas ( $p = 0,039$ ); *MTHFR* A1298C con mucositis moderada-severa ( $p = 0,024$ ); *ABCC4* A311G con neutropenia ( $p = 0,031$ ) y neuropatía moderadas-severas ( $p = 0,018$ ); *ABCC4* T38G con neuropatía moderada-severa ( $p = 0,035$ ); *ABCB1* C1236T con neutropenia ( $p = 0,013$ ) y SMP moderados-severos ( $p = 0,027$ ); y *ABCB1* G2677T/A y *ABCB1* C3435T con SMP ( $p = 0,048$  y  $0,033$ , respectivamente) y RCA moderados-severos ( $p = 0,014$  y  $0,008$ , respectivamente).

En las tablas de contingencia con estas asociaciones significativas se pueden observar los porcentajes de pacientes para cada genotipo que presentaron toxicidad moderada-severa (Tabla 30).

Tabla 29. Valores de p para las asociaciones entre los polimorfismos estudiados y reacciones adversas moderadas-severas (grado  $\geq 2$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos que contienen capecitabina. Se resaltan en rojo aquellos valores de p estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

	<i>DPYD</i> A496G	<i>TYMS</i> 6del	<i>TYMS</i> USF E-box	<i>MTHFR</i> C677T	<i>MTHFR</i> A1298C	<i>ABCC4</i> A311G	<i>ABCC4</i> T38G	<i>ABCC5</i> A1366C	<i>CDA</i> Lys27Gln	<i>ABCB1</i> C1236	<i>ABCB1</i> G2677TA	<i>ABCB1</i> C3435T
Diarrea	0,071	0,261	0,595	0,261	0,703	1	1	0,749	0,627	1	0,373	0,567
Neutropenia	<b>0,029</b>	0,616	0,476	0,324	0,798	<b>0,031</b>	0,059	0,154	0,827	<b>0,013</b>	0,083	0,191
Neuropatía	0,616	0,681	0,696	0,542	0,832	<b>0,018</b>	<b>0,035</b>	0,272	0,469	1	0,431	0,527
SMP	0,363	0,064	0,291	0,505	0,104	1	0,680	0,414	0,844	<b>0,027</b>	<b>0,048</b>	<b>0,033</b>
Astenia	1	0,823	1	0,505	0,487	0,669	0,680	1	0,161	0,271	0,661	0,353
Náuseas/ vómitos	<b>0,022</b>	0,540	0,696	0,542	0,288	0,563	0,707	0,498	0,590	0,233	0,236	0,291
Mucositis	0,685	0,843	0,571	0,164	<b>0,024</b>	0,457	0,364	0,155	0,862	0,703	0,566	1
Anorexia	1	0,372	0,780	0,402	1	0,784	0,794	0,633	1	1	0,777	1
Anemia	0,581	0,816	0,375	0,358	0,334	0,376	0,280	0,074	0,059	0,821	1	0,810
Plaquetopenia	0,292	0,706	0,487	0,501	0,719	0,723	0,734	1	0,754	0,154	0,293	0,231
Leucopenia	<b>0,039</b>	0,464	0,818	0,479	0,451	0,260	0,180	0,657	0,525	0,815	0,642	0,622
RCA	0,588	0,205	0,146	0,324	1	0,816	0,644	0,154	1	0,083	<b>0,014</b>	<b>0,008</b>
Toxicidad hepática	0,184	1	0,335	0,627	0,200	0,634	0,489	0,154	0,658	0,807	1	1
Retraso/ reducción	0,406	1	0,610	0,857	0,098	1	1	0,370	0,429	0,604	0,116	0,137

SMP, síndrome mano-pie; RCA, reacción cutánea acneiforme.

Tabla 30. Tablas de contingencia con las asociaciones estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre polimorfismos y reacciones adversas moderadas-severas (grado  $\geq 2$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina.

Gen (identificación de SNP)	Genotipo	n (%)	Grado de toxicidad [n(%)]		p	Reacción adversa
			0-1	2-4		
<b>DPYD (A496G)</b>	AA	68 (91,9%)	61 (89,7%)	7 (10,3%)	<b>0,029</b>	<b>Neutropenia</b>
	GA	6 (8,1%)	3 (50%)	3 (50%)		
	AA	68 (91,9%)	55 (80,9%)	13 (19,1%)	<b>0,022</b>	<b>Náuseas y vómitos</b>
	GA	6 (8,1%)	2 (33,3%)	4 (66,7%)		
	AA	68 (91,9%)	60 (88,2%)	8 (11,8%)	<b>0,039</b>	<b>Leucopenia</b>
	GA	6 (8,1%)	3 (50%)	3 (50%)		
<b>MTHFR (A1298C)</b>	AA	33 (44,6%)	29 (87,9%)	4 (12,1%)	<b>0,024</b>	<b>Mucositis</b>
	CA	34 (45,9%)	22 (64,7%)	12 (35,3%)		
	CC	7 (9,5%)	4 (57,1%)	3 (42,9%)		
<b>ABCC4 (T38G)</b>	TT	22 (29,7%)	13 (59,1%)	9 (40,9%)	<b>0,035</b>	<b>Neuropatía periférica</b>
	TG	35 (47,3%)	29 (82,9%)	6 (17,1%)		
	GG	17 (23%)	15 (88,2%)	2 (11,8%)		
<b>ABCC4 (A311G)</b>	AA	20 (27%)	15 (75%)	5 (25%)	<b>0,031</b>	<b>Neutropenia</b>
	GA	37 (50%)	32 (86,5%)	5 (13,5%)		
	GG	17 (23%)	17 (100%)	0 (0%)		
	AA	20 (27%)	11 (55%)	9 (45%)	<b>0,018</b>	<b>Neuropatía periférica</b>
	GA	37 (50%)	31 (83,8%)	6 (16,2%)		
	GG	17 (23%)	15 (88,2%)	2 (11,8%)		
<b>ABCB1 (C1236T)</b>	CC	17 (23%)	12 (70,6%)	5 (29,4%)	<b>0,013</b>	<b>Neutropenia</b>
	CT	39 (52,7%)	34 (87,2%)	5 (12,8%)		
	TT	18 (24,3%)	18 (100%)	0 (0%)		
	CC	17 (23%)	11 (64,7%)	6 (35,3%)	<b>0,027</b>	<b>SMP</b>
	CT	39 (52,7%)	33 (84,6%)	6 (15,4%)		
	TT	18 (24,3%)	17 (94,4%)	1 (5,6%)		
<b>ABCB1 (G2677T/A)</b>	GG	22 (29,7%)	14 (63,6%)	8 (36,4%)	<b>0,048</b>	<b>SMP</b>
	GT/A	38 (51,4%)	35 (92,1%)	3 (7,9%)		
	TT	14 (18,9%)	12 (85,7%)	2 (14,3%)		
	GG	22 (29,7%)	21 (95,5%)	1 (4,5%)	<b>0,014</b>	<b>RCA</b>
	GT/A	38 (51,4%)	34 (89,5%)	4 (10,5%)		
	TT	14 (18,9%)	9 (64,3%)	5 (35,7%)		
<b>ABCB1 (C3435T)</b>	CC	16 (21,6%)	10 (62,5%)	6 (37,5%)	<b>0,033</b>	<b>SMP</b>
	CT	43 (58,1%)	37 (86%)	6 (14%)		
	TT	15 (20,3%)	14 (93,3%)	1 (6,7%)		
	CC	16 (21,6%)	16 (100%)	0 (0%)	<b>0,008</b>	<b>RCA</b>
	CT	43 (58,1%)	38 (88,4%)	5 (11,6%)		
	TT	15 (20,3%)	10 (66,7%)	5 (33,3%)		

SMP, síndrome mano-pie; RCA, reacción cutánea acneiforme.

El polimorfismo A496G en *DPYD* se asoció significativamente con neutropenia, náuseas y vómitos y leucopenia moderadas-severas. En todos los casos, la variante G resultó estar relacionada con un alto riesgo de desarrollar el efecto adverso moderado-severo (Tabla 30).

Los portadores de la variante *MTHFR* 1298C tratados con capecitabina, tanto en homocigosis como en heterocigosis, presentaron una mayor frecuencia de mucositis moderada-severa (42,9% y 35,3%, respectivamente) que los pacientes homocigotos para la variante 1298A (12,1%) (Tabla 30).

El polimorfismo T38G del gen *ABCC4* se asoció significativamente con neuropatía moderada-severa, de tal manera que los pacientes portadores en homocigosis del alelo T tuvieron un mayor riesgo de sufrir dicha reacción adversa (40,9%) que los portadores de la variante G, tanto en heterocigosis (17,1%) como en homocigosis (11,8%) (Tabla 30). El alelo A en el polimorfismo *ABCC4* A311G se asoció a un mayor riesgo de padecer neutropenia y neuropatía periférica a lo largo del tratamiento. Así, los individuos homocigotos para el alelo A desarrollaron mayor neutropenia y neuropatía periférica (25% y 45%, respectivamente) que los heterocigotos (13,5% y 16,2%, respectivamente) u homocigotos para el alelo G (0% y 11,8%, respectivamente).

Del gen *ABCB1* se obtuvieron asociaciones significativas para los tres SNPs estudiados C1236T, G2677A/T y C3435T. En dos de las tres reacciones adversas asociadas a variantes de este gen (neutropenia y SMP), el alelo T resultó ser un marcador de baja probabilidad de desarrollar el efecto adverso. Sin embargo, para RCA el resultado fue el contrario, de forma que el poseer la variante T se asoció a una mayor probabilidad de desarrollar RCA moderada-severa. Cabe destacar que los tres polimorfismos resultaron estadísticamente significativos en el caso de SMP.

Si se analizan, al igual que en el caso de los pacientes tratados con 5-FU, los resultados obtenidos con los tres polimorfismos analizados en *ABCB1*, se observa que, para cualquiera de las tres variantes analizadas, el alelo T protege contra el desarrollo tanto de neutropenia como de SMP moderado-severo (Tabla 31).

Tabla 31. Tablas de contingencia con las asociaciones entre los polimorfismos analizados en *ABCB1* y neutropenia y síndrome mano-pie moderados-severos (grado  $\geq 2$ ) en la población tratada con capecitabina. Se resaltan en rojo aquellos valores de p estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

Genotipos	n (%)	Neutropenia [n (%)]			SMP [n (%)]		
		0-1	2-4	p	0-1	2-4	p
ABCB1 C1236T							
CC	17 (23%)	12 (70,6%)	5 (29,4%)	0,013	11 (64,7%)	6 (35,3%)	0,027
CT	39 (52,7%)	34 (87,2%)	5 (12,8%)		33 (84,6%)	6 (15,4%)	
TT	18 (24,3%)	18 (100%)	0 (0%)		17 (94,4%)	1 (5,6%)	
ABCB1 G2667T/A							
GG	22 (29,7%)	17 (77,3%)	5 (22,7%)	0,083	14 (63,6%)	8 (36,4%)	0,048
GT/A	38 (51,4%)	33 (86,8%)	5 (13,2%)		35 (92,1%)	3 (7,9%)	
TT	14 (18,9%)	14 (100%)	0 (0%)		12 (85,7%)	2 (14,3%)	
ABCB1 C3435T							
CC	16 (21,6%)	13 (81,2%)	3 (18,8%)	0,191	10 (62,5%)	6 (37,5%)	0,033
CT	43 (58,1%)	36 (83,7%)	7 (16,3%)		37 (86%)	6 (14%)	
TT	15 (20,3%)	15 (100%)	0 (0%)		14 (93,3%)	1 (6,7%)	

SMP, síndrome mano-pie.

Los hallazgos más relevantes en este análisis son dos: por un lado, ninguno de los 18 pacientes con la variante 1236T en el gen *ABCB1* en homocigosis presentó neutropenia moderada-severa; por otro lado, es destacable también el hecho de que los tres polimorfismos estudiados en el gen *ABCB1* estén estadísticamente asociados a SMP moderado-severo.

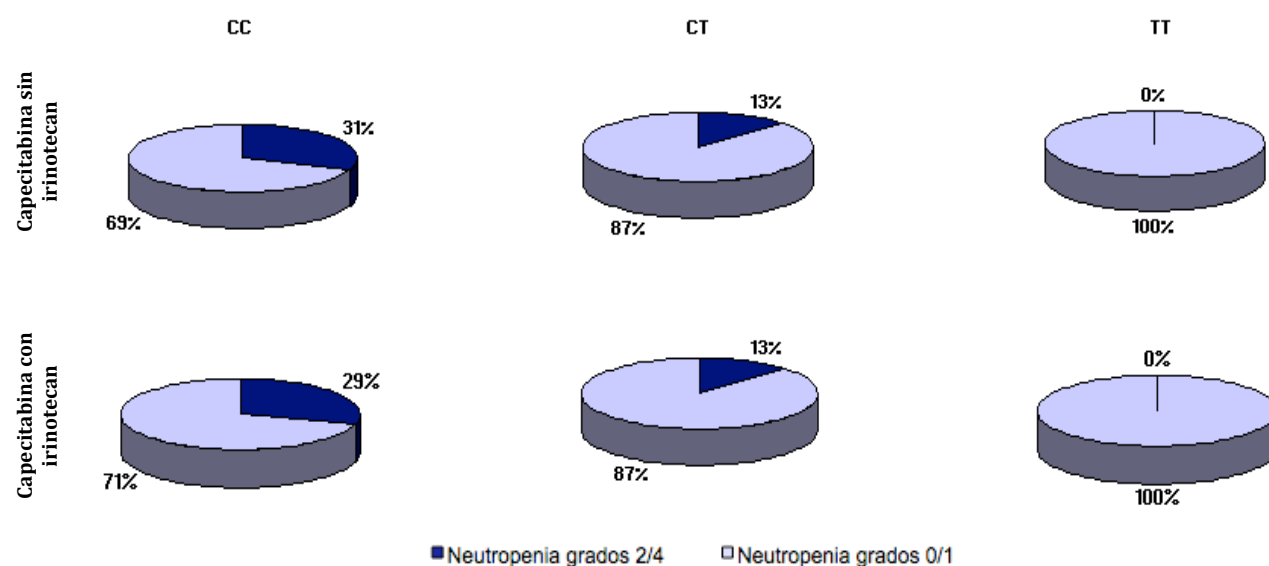
Al igual que en los tratamientos basados en 5-FU, se decidió rehacer el análisis excluyendo a los pacientes tratados con irinotecan, con el objetivo de eliminar el posible efecto de este último en las asociaciones obtenidas. Como resultado, se mantuvo estadísticamente significativa la asociación entre neutropenia y el polimorfismo *ABCB1* C1236T ( $p = 0,045$ ) (Tabla 32).

Tabla 32. Tabla de contingencia con la asociación entre *ABCB1* C1236T y neutropenia moderada-severa (grado  $\geq 2$ ) en pacientes tratados con regímenes basados en capecitabina excluyendo combinaciones con irinotecan.

Genotipos <i>ABCB1</i> C1236T	Tratamiento basado en capecitabina (excluido irinotecan)			
	n (%)	Neutropenia [n(%)]		p
		0-1	2-4	
CC	13 (24%)	9 (69,2%)	4 (30,8%)	<b>0,045</b>
CT	30 (55,6%)	26 (86,7%)	4 (13,3%)	
TT	11 (20,4%)	11 (100%)	0 (0%)	



Figura 26. Proporción de pacientes que desarrollaron neutropenia moderada-severa (grado  $\geq 2$ ) en función del genotipo de *ABCB1* C1236T y la presencia o no de irinotecan en el régimen.



De los pacientes tratados con regímenes basados en capecitabina que desarrollaron neutropenia moderada-severa, 29,4% eran homocigotos CC para el polimorfismo *ABCB1* C1236T, 12,8% eran heterocigotos; ninguno de ellos era homocigoto TT (Tabla 31). Cuando se excluyeron los pacientes tratados con irinotecan, los porcentajes de neutropenia moderada-severa fueron 30,8% para homocigotos CC, 13,3% para heterocigotos CT y 0% para homocigotos TT (Tabla 32). Esta similitud de porcentajes entre ambas muestras de pacientes (con o sin irinotecan), que se observa de forma clara en la Figura 26, pone de manifiesto que la asociación entre el SNP C1236T con neutropenia moderada-severa es independiente del tratamiento con irinotecan. Sin embargo, no se mantuvo estadísticamente significativa la asociación entre este polimorfismo y la aparición de SMP al excluir a los pacientes tratados con irinotecan. A pesar de ello, los porcentajes de SMP grado 2 o mayor fueron 30,8%, 16,7% y 9,1% para CC, CT y TT, respectivamente. Estos resultados fueron muy parecidos a los obtenidos en los pacientes tratados con regímenes basados en capecitabina sin excluir a aquéllos que habían recibido irinotecan, lo que indica que la falta de significación estadística se deba probablemente a la disminución del tamaño muestral.

La Figura 27 muestra la probabilidad de desarrollar neutropenia, diarrea y SMP dependiendo del genotipo en *ABCB1* y del fármaco administrado. El hecho de ser homocigoto para la variante T en cualquiera de los polimorfismos estudiados en *ABCB1*

conlleva una menor probabilidad, en comparación con el genotipo homocigoto salvaje, de padecer neutropenia y SMP moderado-severo con esquemas basados en capecitabina. Sin embargo, el genotipo homocigoto salvaje supone una menor probabilidad de desarrollar diarrea moderada-severa con regímenes que contienen 5-FU en comparación con el genotipo CT o TT.

Figura 27. Porcentaje de pacientes que presentaron neutropenia (A), diarrea (B) y síndrome mano-pie (C) moderados-severos (grado  $\geq 2$ ) en función del genotipo de *ABCB1* (C1236T o rs1128503, G2677T/A o rs2032583 y C3435T o rs1045642) y el tratamiento. Los datos de pacientes tratados con regímenes basados en capecitabina aparecen representados en oscuro y los de 5-FU, en claro.

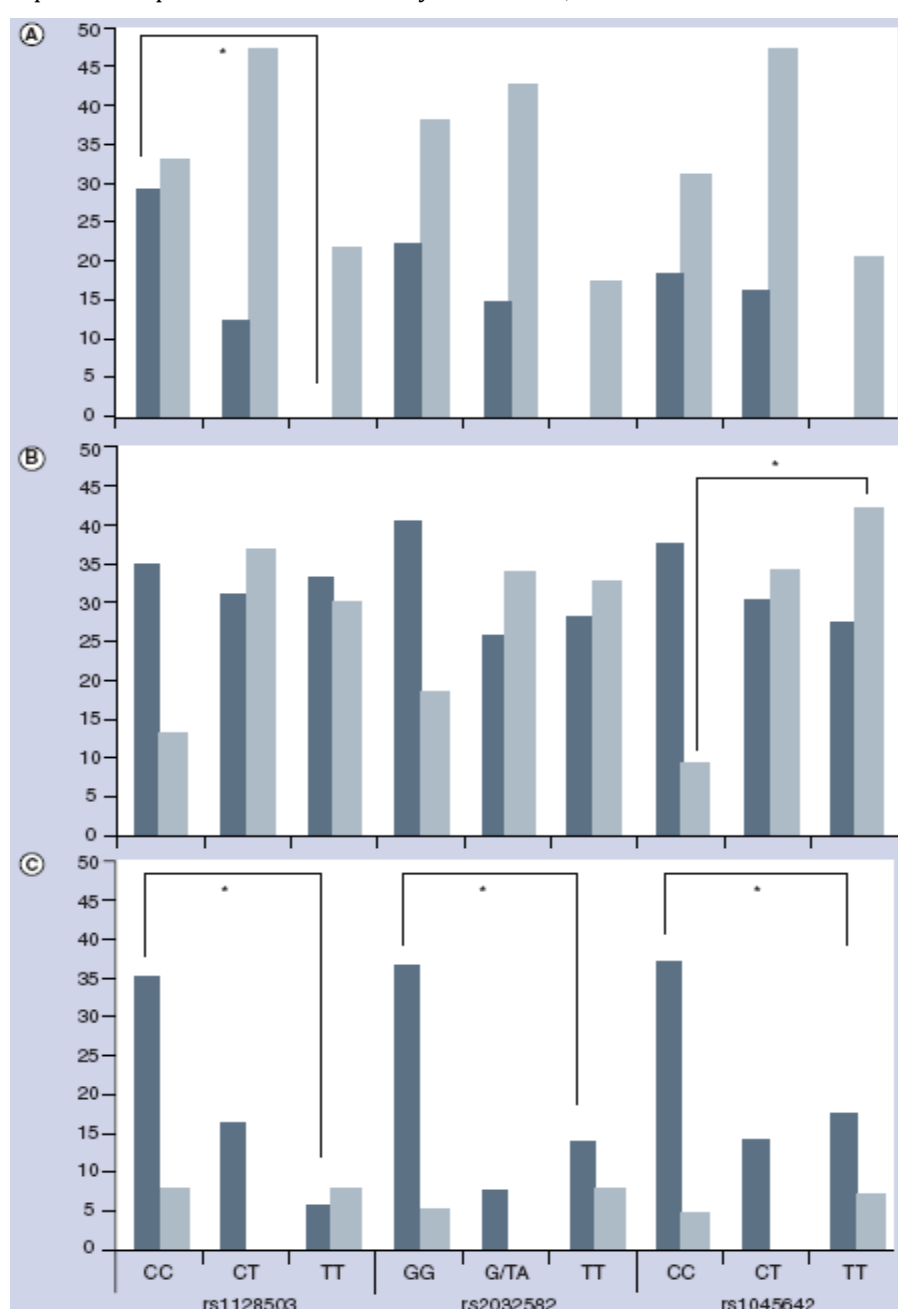


Tabla 33. Regresión logística con las asociaciones que se mantuvieron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre polimorfismos y reacciones adversas moderadas-severas (grado  $\geq 2$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina.

Variable	OR	95% IC	p
<b>Neutropenia</b>			
<b><i>DPYD</i> (A496G)</b>			
AA vs. GA	0,115	0,014 a 0,955	<b>0,045</b>
<b>Náuseas y vómitos</b>			
<b><i>DPYD</i> (A496G)</b>			
AA vs. GA	0,095	0,014 a 0,636	<b>0,015</b>
<b>Mucositis</b>			
<b><i>MTHFR</i> (A1298C)</b>			
AA vs. CA	0,249	0,070 a 0,883	<b>0,031</b>
AA vs. CA/CC	0,234	0,068 a 0,803	<b>0,021</b>
<b>Neuropatía periférica</b>			
<b><i>ABCC4</i> (T38G)</b>			
TG vs. TT	0,265	0,074 a 0,946	<b>0,041</b>
GG vs. TT	0,159	0,027 a 0,940	<b>0,043</b>
TG/GG vs. TT	0,229	0,070 a 0,755	<b>0,015</b>
<b><i>ABCC4</i> (A311G)</b>			
GG vs. AA	0,138	0,023 a 0,824	<b>0,030</b>
GA vs. AA	0,218	0,060 a 0,787	<b>0,020</b>
GA/GG vs. AA	0,192	0,057 a 0,642	<b>0,007</b>
<b>SMP</b>			
<b><i>ABCB1</i> (C1236T)</b>			
TT vs. CC	0,071	0,007 a 0,744	<b>0,027</b>
CT/TT vs. CC	0,191	0,048 a 0,757	<b>0,018</b>
<b><i>ABCB1</i> (G2677T/A)</b>			
GT/A vs. GG	0,114	0,024 a 0,541	<b>0,006</b>
GT/A o TT vs. GG	0,142	0,036 a 0,554	<b>0,005</b>
<b><i>ABCB1</i> (C3435T)</b>			
CT vs. CC	0,209	0,050 a 0,870	<b>0,031</b>
CT/TT vs. CC	0,181	0,046 a 0,715	<b>0,015</b>
<b>RCA</b>			
<b><i>ABCB1</i> (G2677T/A)</b>			
GG vs. TT	0,090	0,009 a 0,929	<b>0,043</b>
GG o GT/A vs. TT	0,170	0,039 a 0,746	<b>0,019</b>
<b><i>ABCB1</i> (C3435T)</b>			
CT vs. TT	0,205	0,044 a 0,961	<b>0,044</b>
CC/CT vs. TT	0,147	0,032 a 0,677	<b>0,014</b>

OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza; SMP, síndrome mano-pie; RCA, reacción cutánea acneiforme.

Tras el análisis univariante, las trece asociaciones estadísticamente significativas entre polimorfismos y efectos adversos al tratamiento con capecitabina se sometieron a una regresión logística. La gran mayoría de las asociaciones (diez de trece) se mantuvieron estadísticamente significativas al tener en cuenta el posible efecto del sexo y del PS de los pacientes en el desarrollo de toxicidad: *DPYD* A496G con neutropenia y náuseas y vómitos moderados-severos; *MTHFR* A1298C con mucositis moderada-severa; *ABCC4* T38G y A311G con neuropatía periférica moderada-severa; los tres SNPs en *ABCB1* (C1236T, G2677T/A y C3435T) con SMP moderado-severo; y *ABCB1* G2677T/A y C3435T con RCA moderada-severa (Tabla 33).

Para verificar que la asociación obtenida entre los polimorfismos en *ABCC4* (A311G y T38G) y neuropatía moderada-severa no estaba siendo distorsionada por la presencia de oxaliplatino (asociado a capecitabina en el 54% de los pacientes), se llevó a cabo una regresión logística incluyendo nuevamente el oxaliplatino como covariable. La asociación entre la presencia de oxaliplatino y el desarrollo de neuropatía resultó estadísticamente significativa, al igual que la asociación con los dos polimorfismos analizados en *ABCC4*, tal y como se indica en la Tabla 34.

Tabla 34. Regresión logística incluyendo la presencia de oxaliplatino en el esquema basado en capecitabina y *ABCC4* (A311G y T38G) como covariables en cuanto a la aparición de neuropatía moderada-severa (grado  $\geq 2$ ).

Variable	OR	95% IC	p
<b>Neuropatía moderada-severa</b>			
<i>ABCC4</i> (A311G): GA vs. AA	0,202	0,052 a 0,782	<b>0,021</b>
Oxaliplatino	7,117	1,672 a 30,285	<b>0,008</b>
<b>Neuropatía moderada-severa</b>			
<i>ABCC4</i> (T38G): GG vs. TT	0,221	0,057 a 0,855	<b>0,029</b>
Oxaliplatino	7,800	1,824 a 33,351	<b>0,006</b>

OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confianza.

Al verificar en la regresión logística el efecto de oxaliplatino en la asociación obtenida entre neuropatía moderada-severa y los polimorfismos en *ABCC4*, se decidió realizar un nuevo análisis univariante excluyendo a los pacientes tratados con oxaliplatino. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 35.

Tabla 35. Tablas de contingencia con las asociaciones entre *ABCC4* (A311G y T38G) y neuropatía periférica moderada-severa (grado  $\geq 2$ ) en pacientes tratados con regímenes basados en capecitabina excluyendo combinaciones con oxaliplatino.

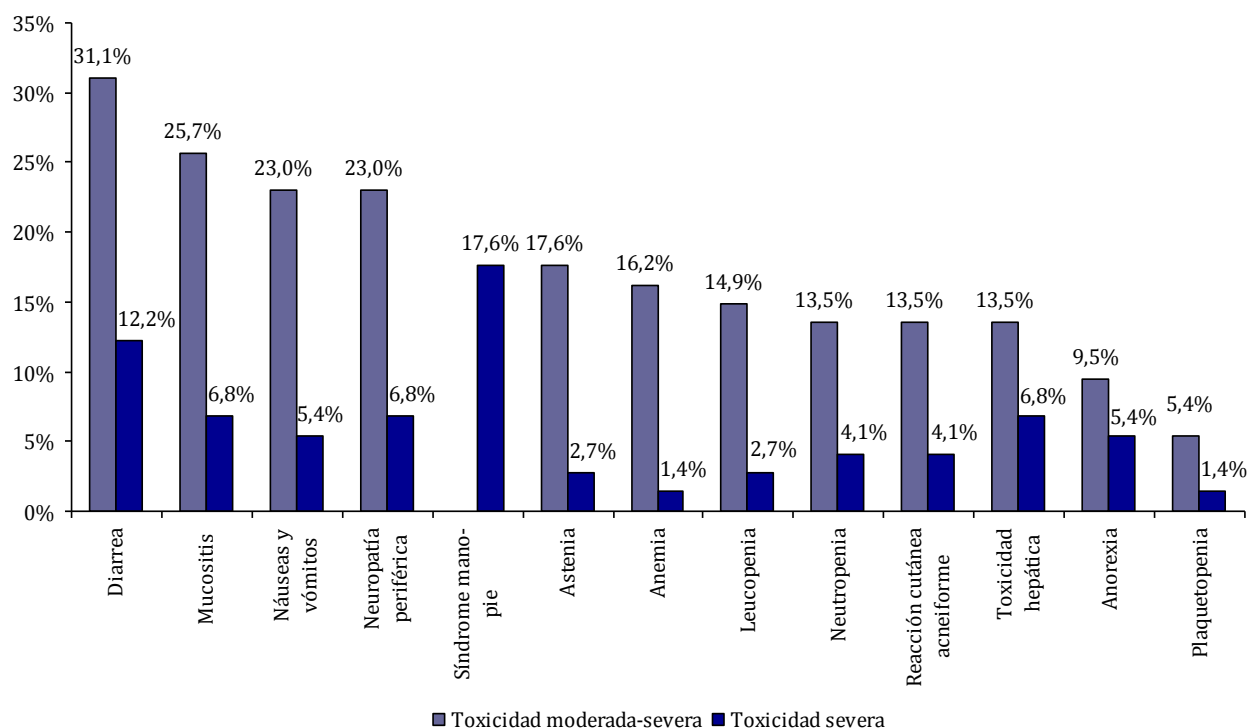
Genotipos <i>ABCC4</i>		Tratamiento basado en capecitabina (excluido oxaliplatino)			
		n (%)	Neuropatía periférica n [(%)]		p
			0-1	2-4	
A311G					
AA	8 (21,6%)	6 (75%)	2 (25%)	0,102	
GA	16 (43,2%)	15 (93,8%)	1 (6,3%)		
GG	13 (35,1%)	13 (100%)	0 (0%)		
T38G					
TT	10 (27%)	8 (80%)	2 (20%)	0,133	
TG	14 (37,8%)	13 (92,9%)	1 (7,1%)		
GG	13 (35,1%)	13 (100%)	0 (0%)		

Al excluir los tratamientos con oxaliplatino, estas asociaciones no resultaron estadísticamente significativas, pero se puede observar que las tendencias se mantuvieron y que los alelos G para las posiciones 311 y 38 del gen *ABCC4* se relacionaron con un menor riesgo de desarrollar neuropatía periférica moderada-severa.

#### 4.5.4.- Reacciones adversas severas a capecitabina. Análisis estadístico

Al igual que con los pacientes que habían sido tratados con 5-FU, se analizaron estadísticamente los datos considerando los siguientes grupos de pacientes en función de la toxicidad: toxicidad severa (grados 3 y 4) y no toxicidad (grado  $\leq 2$ ), a excepción de SMP, para el que se consideró toxicidad severa cuando el grado fue  $\geq 2$ . El porcentaje de pacientes que presentaron efectos adversos severos fue sensiblemente menor que el porcentaje de pacientes que presentaron efectos adversos moderados-severos, como cabía esperar (Figura 28).

Figura 28. Reacciones adversas moderadas-severas (grado  $\geq 2$ ) y severas (grado  $\geq 3$ ) desarrolladas por los pacientes tratados con regímenes basados en capecitabina. Se consideró síndrome mano-pie severo cuando el grado fue  $\geq 2$ .



Dos asociaciones entre polimorfismos y efectos adversos severos al tratamiento con capecitabina resultaron estadísticamente significativas en el análisis univariante (Tabla 36): se confirmó la asociación entre *DPYD* A496G con náuseas y vómitos ( $p = 0,031$ ) y se obtuvo una asociación diferente: *TYMS* 6del con náuseas y vómitos ( $p = 0,025$ ).

Tabla 36. Valores de p para las asociaciones entre los polimorfismos estudiados y reacciones adversas severas (grado  $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos que contienen capecitabina. Se resaltan en rojo aquellos valores de p estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

	<i>DPYD</i> A496G	<i>TYMS</i> 6del	<i>TYMS</i> USF E-box	<i>MTHFR</i> C677T	<i>MTHFR</i> A1298C	<i>ABCC4</i> A311G	<i>ABCC4</i> T38G	<i>ABCC5</i> A1366C	<i>CDA</i> Lys27Gln	<i>ABCB1</i> C1236T	<i>ABCB1</i> G2677TA	<i>ABCB1</i> C3435T
Diarrea	1	0,799	0,802	0,285	1	0,218	0,330	0,635	1	0,313	0,621	0,786
Neutropenia	0,227	0,407	0,707	0,242	0,380	0,686	0,697	0,326	0,500	0,429	0,689	1
Neuropatía	1	0,743	1	0,493	0,723	0,750	0,355	0,151	1	1	1	1
Astenia	1	0,284	0,385	1	0,585	0,628	0,641	1	1	0,352	0,119	0,577
Nauseas/ vómitos	<b>0,031</b>	<b>0,025</b>	0,064	1	1	0,484	0,489	0,696	0,337	0,482	0,293	0,693
Mucositis	1	0,489	0,516	0,758	0,723	0,750	0,355	1	1	0,740	0,507	0,723
Anorexia	0,292	0,134	0,719	1	0,719	1	1	0,696	1	0,482	0,729	1
Anemia	1	0,514	1	0,676	0,541	1	1	1	0,176	1	1	1
Plaquetopenia	1	0,914	0,662	0,676	1	1	1	1	1	0,230	0,486	0,419
Leucopenia	0,157	0,133	0,097	1	0,096	1	1	0,230	0,671	0,352	0,626	1
RCA	1	0,662	0,406	0,719	0,657	1	1	0,069	0,709	0,675	0,083	0,085
Toxicidad hepática	0,353	1	0,516	1	0,723	1	1	1	0,369	0,316	0,335	0,496

RCA, reacción cutánea acneiforme.

Tabla 37. Tablas de contingencia con las asociaciones estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre polimorfismos y reacciones adversas severas (grado  $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina.

Gen (identificación de SNP)	Genotipo	n (%)	Grado de toxicidad [n(%)]		p	Reacción adversa
			0-2	3-4		
<b>DPYD (A496G)</b>	AA	68 (91,9%)	66 (97,1%)	2 (2,9%)	<b>0,031</b>	<b>Náuseas y vómitos</b>
	GA	6 (8,1%)	4 (66,7%)	2 (33,3%)		
<b>TYMS (6del)</b>	WT/WT	29 (39,2%)	29 (100%)	0 (0%)	<b>0,025</b>	<b>Náuseas y vómitos</b>
	del/WT	36 (48,6%)	34 (94,4%)	2 (5,6%)		
	del/del	9 (12,2%)	7 (77,8%)	2 (22,2%)		

Como se observa en la Tabla 37, los pacientes con la variante *TYMS* 6del en homocigosis tuvieron mayor riesgo de padecer náuseas y vómitos severos a lo largo del tratamiento (22,2%) que los pacientes portadores de la variante en heterocigosis (5,6%); a su vez, estos últimos tuvieron mayor riesgo en comparación con los homocigotos para el alelo salvaje (0%). Esta tendencia a presentar mayor riesgo de náuseas y vómitos en pacientes homocigotos para la variante *TYMS* 6del también se obtuvo al analizar toxicidad moderada-severa (33,3% en pacientes homocigotos para la delección, 22,2% en heterocigotos y 20,7% en homocigotos para el alelo salvaje), aunque la asociación no alcanzó significación estadística ( $p = 0,540$ ).

Las asociaciones de *DPYD* A496G y *TYMS* 6del con náuseas y vómitos severos se mantuvieron estadísticamente significativas tras una regresión logística ajustada por el sexo y el PS de los pacientes (Tabla 38).

Tabla 38. Regresión logística con las asociaciones que se mantuvieron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre polimorfismos y reacciones adversas severas (grado  $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en capecitabina.

Variable	OR	95% IC	p
<b>Náuseas y vómitos</b>			
<b>DPYD (A496G)</b>			
AA vs. GA	0,036	0,002 a 0,540	<b>0,016</b>
<b>TYMS (6del)</b>			
WT/del o WT/WT vs. del/del	0,105	0,012 a 0,945	<b>0,044</b>

OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza.



Los pacientes portadores del genotipo AA para el polimorfismo A496G en *DPYD* presentaron una menor probabilidad de desarrollar náuseas y vómitos severos que los pacientes que presentaban el genotipo GA (OR: 0,036; IC 95%: 0,002-0,540;  $p = 0,016$ ) (Tabla 38). A su vez, los pacientes heterocigotos y homocigotos (WT/del y WT/WT) para el alelo salvaje en *TYMS* 6del también mostraron una menor probabilidad de sufrir náuseas y vómitos severos que los pacientes homocigotos del/del (OR: 0,105; IC 95%: 0,012-0,945;  $p=0,044$ ).

#### 4.6.- Identificación de polimorfismos genéticos asociados a reacciones adversas al tratamiento con regímenes quimioterápicos que contienen oxaliplatino en pacientes de CCR

##### 4.6.1.- Características basales de los pacientes

Para el análisis de las posibles asociaciones entre polimorfismos y reacciones adversas severas a regímenes quimioterápicos basados en oxaliplatino en pacientes de CCR se incluyeron 106 pacientes con las características basales detalladas en la Tabla 39.

Tabla 39. Características basales de los pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en oxaliplatino.

Parámetro	n (%)	
Pacientes		
	Hombres	62 (58,5%)
	Mujeres	44 (41,5%)
	Total	106 (100%)
Edad (años) mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> )		69 (56-76)
ECOG PS		
	0	63 (59,4%)
	1	39 (36,8%)
	>1	4 (3,8%)
Tipo de cáncer		
	Colon	72 (67,9%)
	Recto	34 (32,1%)
Tiempo de evolución (años) mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> )		4 (3-5)
Grado del tumor		
	I	1 (0,9%)
	II	12 (11,3%)
	III	29 (27,4%)
	IV	64 (60,4%)
Tratamiento previo		
	Sin tratamiento previo	29 (27,4%)
	Cirugía	68 (64,2%)
	Cirugía + Radioterapia	9 (8,5%)
Otros fármacos		
	5-FU	62 (58,5%)
	Capecitabina	40 (37,7%)
	Cetuximab	10 (9,4%)
	Bevacizumab	29 (27,4%)
	Panitumumab	1 (0,9%)
	Raltitrexed	4 (3,8%)

ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group performance status.

De nuevo, no hubo desviaciones importantes con respecto a las características basales del conjunto de los 137 pacientes incluidos en el estudio (Tabla 13). La mayoría de estos pacientes habían sido tratados previamente con cirugía (64,2%) y los fármacos más frecuentemente asociados a oxaliplatino fueron 5-FU, capecitabina y bevacizumab (58,5%, 37,7% y 27,4%, respectivamente).

#### 4.6.2.- Polimorfismos analizados

Dado que existen estudios que han encontrado asociaciones entre variaciones del ADN en genes relacionados con oxaliplatino y respuesta al tratamiento con irinotecan<sup>63,178-181</sup>, se decidió, en este análisis y en el siguiente con pacientes tratados con esquemas basados en irinotecan, estudiar las variaciones de ADN de genes asociados tanto a oxaliplatino como a irinotecan de manera conjunta (Tabla 40).

Tabla 40. Polimorfismos/CNV analizados en pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en oxaliplatino o irinotecan.

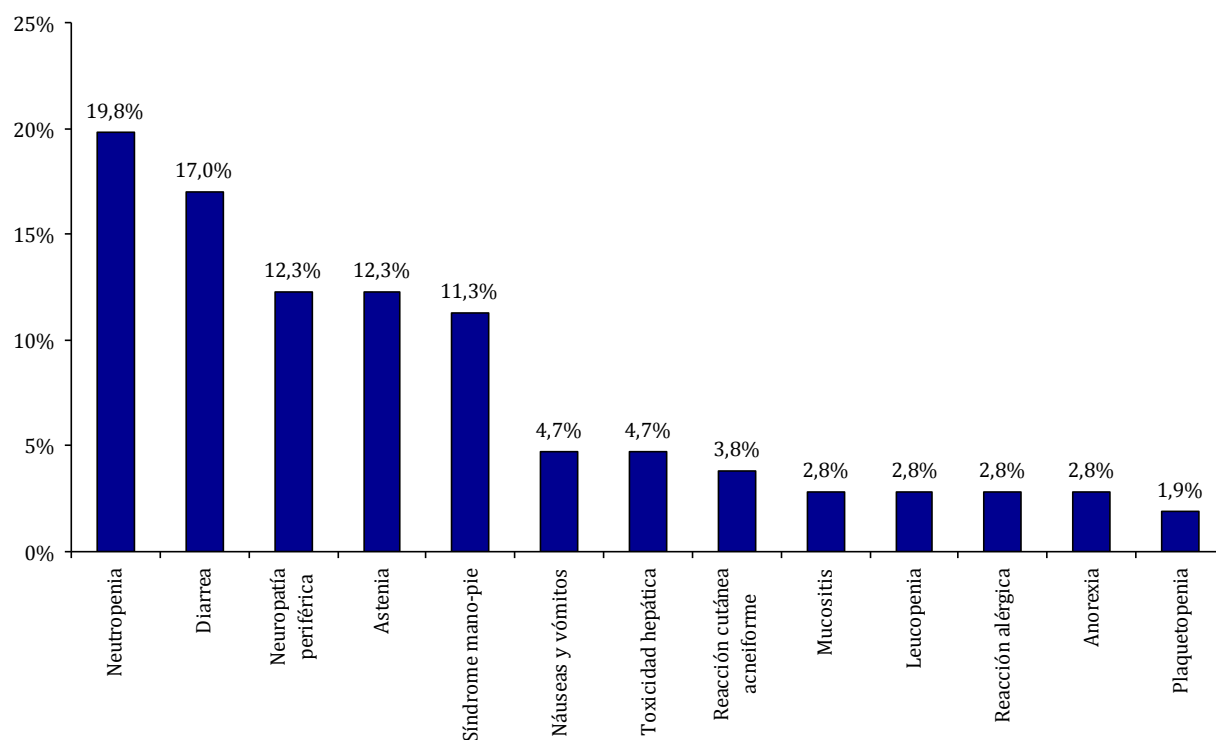
Gen	Polimorfismo/CNV	
	Identificación rs (dbSNP)	Identificación en el texto de esta memoria
<b>Oxaliplatino</b>		
<i>XRCC1</i>	rs25487	<i>XRCC1</i> Gln399Arg
<i>ERCC1</i>	rs11615	<i>ERCC1</i> Asn118Asn
<i>ERCC2</i>	rs13181	<i>ERCC2</i> Lys751Gln
<i>GSTP1</i>	rs1695	<i>GSTP1</i> Ile105Val
<i>GSTT1</i>	NA	<i>GSTT1</i> CNV
<i>EGFR</i>	rs45559542	<i>EGFR</i> intrón 1 (CA) <sub>n</sub>
<b>Irinotecan</b>		
<i>UGT1A1</i>	rs8175347	<i>UGT1A1</i> *28
	rs10929302	<i>UGT1A1</i> *93
<i>ABCB1</i>	rs1128503	<i>ABCB1</i> C1236T
	rs2032582	<i>ABCB1</i> G2677T/A
	rs1045642	<i>ABCB1</i> C3435T

CNV, variación del número de copias; dbSNP, *Single Nucleotide Polymorphism database*; NA, no aplica.

#### 4.6.3.- Reacciones adversas a oxaliplatino. Análisis estadístico

En este análisis y posteriores se decidió llevar a cabo el tratamiento estadístico únicamente para las toxicidades consideradas severas (grado  $\geq 3$ ), excepto para SMP, en el que, al tener 3 como máximo grado de toxicidad, se consideraron toxicidades severas los grados 2 y 3; este criterio para agrupar las reacciones adversas se ha consolidado en las publicaciones sobre farmacogenética durante los últimos años. En la Figura 29 se presentan los efectos adversos severos desarrollados por los pacientes tratados con regímenes que contienen oxaliplatino.

Figura 29. Reacciones adversas severas (grado  $\geq 3$ ) desarrolladas por los pacientes tratados con regímenes basados en oxaliplatino. Se consideró síndrome mano-pie severo cuando el grado fue  $\geq 2$ .



En este caso, las reacciones adversas severas más comunes fueron neutropenia (19,8%), diarrea (17%), astenia (12,3%) y neuropatía periférica (12,3%), el efecto adverso más característico del tratamiento con oxaliplatino. No hubo ningún paciente que desarrollara anemia grado  $> 2$  al tratamiento. Un 77,4% de los pacientes tratados con esquemas quimioterápicos que contenían oxaliplatino sufrieron retrasos o reducciones de dosis a lo largo de su tratamiento.

Tabla 41. Valores de p para las asociaciones entre los polimorfismos estudiados y reacciones adversas severas (grado  $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos que contienen oxaliplatino. Se consideró síndrome mano-pie severo cuando el grado fue  $\geq 2$ . Se resaltan en rojo aquellos valores de p estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

	<i>XRCC1</i> Gln399Arg	<i>ERCC1</i> Asn118Asn	<i>ERCC2</i> Lys751Gln	<i>GSTP1</i> Ile105Val	<i>GSTT1</i> CNV	<i>EGFR</i> intrón(CA) <sub>n</sub>	<i>UGT1A1</i> *28	<i>UGT1A1</i> *93	<i>ABCB1</i> C1236T	<i>ABCB1</i> G2677T/A	<i>ABCB1</i> C3435T
Náuseas/ vómitos	1	0,350	<b>0,024</b>	0,728	0,638	1	1	0,704	1	0,310	0,493
Diarrea	0,376	0,585	0,684	0,550	0,776	0,308	0,244	0,488	0,270	0,122	0,125
Mucositis	0,240	1	1	0,157	0,955	0,243	0,613	0,649	0,404	1	1
Neutropenia	0,738	<b>0,026</b>	0,122	0,443	0,445	0,810	0,119	0,192	0,603	1	0,588
Plaquetopenia	0,669	1	0,578	0,592	0,181	0,495	0,233	0,284	1	0,654	0,106
Leucopenia	0,240	0,439	0,648	0,157	0,955	1	1	1	0,692	0,396	0,202
Neuropatía	1	0,542	0,489	0,169	0,297	0,773	0,591	0,793	0,297	1	0,829
RCA	0,501	0,725	0,254	0,426	0,946	0,618	0,652	0,646	0,137	0,250	0,444
Reacción alérgica	0,430	0,439	0,648	0,398	0,955	0,614	1	0,649	0,224	0,396	1
Toxicidad hepática	0,755	0,759	0,150	0,470	0,638	1	0,421	0,407	0,338	0,500	0,741
Astenia	0,840	0,839	0,641	0,650	0,107	1	0,432	0,287	1	1	0,829
Anorexia	0,240	1	0,157	0,398	1	0,614	1	0,649	1	0,668	0,380
SMP	0,673	0,520	0,811	0,811	0,348	0,232	0,274	0,167	0,515	0,367	0,497
Retraso/ reducción	0,200	1	0,101	0,202	0,890	0,489	0,402	0,837	0,740	0,299	0,863

RCA, reacción cutánea acneiforme; SMP, síndrome mano-pie.

Se realizaron tablas de contingencia y el test  $\chi^2$ , aplicando el estadístico exacto de Fisher para encontrar asociaciones entre variaciones genéticas y efectos adversos al tratamiento que contenía oxaliplatino. Los valores de p obtenidos aparecen en la Tabla 41.

En este estudio se obtuvieron dos asociaciones estadísticamente significativas: *ERCC1* Asn118Asn con neutropenia ( $p = 0,026$ ), y *ERCC2* Lys751Gln con náuseas y vómitos ( $p = 0,024$ ).

Tabla 42. Tablas de contingencia con las asociaciones estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre polimorfismos y reacciones adversas severas (grado  $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en oxaliplatino.

Gen (identificación de SNP)	Genotipo	n (%)	Grado de toxicidad [n(%)]		p	Reacción adversa
			0-2	3-4		
<b><i>ERCC1</i> (Asn118Asn)</b>	TT	44 (41,5%)	38 (86,4%)	6 (13,6%)	<b>0,026</b>	<b>Neutropenia</b>
	CT	46 (43,4%)	38 (82,6%)	8 (17,4%)		
	CC	16 (15,1%)	9 (56,3%)	7 (43,8%)		
<b><i>ERCC2</i> (Lys751Gln)</b>	AA	46 (43,4%)	41 (89,1%)	5 (10,9%)	<b>0,024</b>	<b>Náuseas y vómitos</b>
	CA	51 (48,1%)	51 (100%)	0 (0%)		
	CC	9 (8,5%)	9 (100%)	0 (0%)		

Los pacientes con el genotipo CC para Asn118Asn en el gen *ERCC1* presentaron mayor riesgo de desarrollar neutropenia severa (43,8%) que los pacientes con los genotipos CT y TT (17,4% y 13,6%, respectivamente) (Tabla 42).

Por otro lado, ninguno de los pacientes tratados con oxaliplatino y portadores del genotipo CC o CA para el polimorfismo Lys751Gln en *ERCC2* presentó náuseas ni vómitos severos en comparación con el 10,9% de los pacientes homocigotos AA (Tabla 42).

Cuando se sometieron los datos a un análisis por regresión logística que tenía en cuenta el sexo y el PS, sólo fue confirmada la asociación entre Asn118Asn en *ERCC1* con neutropenia (Tabla 43). Así, tanto los pacientes homocigotos para la variante T (OR: 0,198; 95% IC: 0,05-0,791;  $p = 0,022$ ) como los heterocigotos (OR: 0,207; 95% IC: 0,055-0,784;  $p = 0,02$ ) presentaron una menor probabilidad de sufrir neutropenia severa que los homocigotos CC. La comparación de los individuos portadores del alelo C en homocigosis frente al resto

también mostró un menor riesgo de los últimos de padecer neutropenia (OR: 0,203; 95% IC: 0,06-0,683;  $p = 0,01$ ).

Tabla 43. Regresión logística con la asociación que se mantuvo estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre polimorfismos y reacciones adversas severas (grado  $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en oxaliplatino.

Variable	OR	95% IC	p
<b>Neutropenia</b>			
<b><i>ERCC1</i> (Asn118Asn)</b>			
TT vs. CC	0,198	0,050 a 0,791	<b>0,022</b>
CT vs. CC	0,207	0,055 a 0,784	<b>0,020</b>
CT/TT vs. CC	0,203	0,060 a 0,683	<b>0,010</b>

OR, *odds ratio*; IC, intervalo de confianza.

#### 4.7.- Identificación de polimorfismos genéticos asociados a reacciones adversas al tratamiento con regímenes quimioterápicos que contienen irinotecan en pacientes de CCR

##### 4.7.1.- Características basales de los pacientes

Con el objetivo de identificar asociaciones entre polimorfismos genéticos y reacciones adversas a tratamientos basados en irinotecan se analizaron 56 pacientes que fueron tratados con regímenes quimioterápicos que contenían irinotecan.

Tabla 44. Características basales de los pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en irinotecan.

Parámetro	n (%)	
Pacientes		
	Hombres	33 (58,9%)
	Mujeres	23 (41,1%)
	Total	56 (100%)
Edad (años) mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> )	65 (53-73)	
ECOG PS		
	0	28 (50%)
	1	26 (46,4%)
	>1	2 (3,6%)
Tipo de cáncer		
	Colon	34 (60,7%)
	Recto	22 (39,3%)
Tiempo de evolución (años) mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> )	5 (3-5)	
Grado del tumor		
	III	2 (3,6%)
	IV	54 (96,4%)
Tratamiento previo		
	Sin tratamiento previo	23 (41,1%)
	Cirugía	28 (50%)
	Cirugía + Radioterapia	5 (8,9%)
Otros fármacos		
	5-FU	29 (51,8%)
	Capecitabina	22 (39,3%)
	Cetuximab	13 (23,2%)
	Bevacizumab	38 (67,9%)
	Panitumumab	1 (1,8%)

ECOG PS, Eastern Cooperative Oncology Group performance status.



De nuevo, las características basales de este subgrupo de pacientes, detalladas en la Tabla 44, se asemejan mucho a las características del conjunto de los 137 pacientes incluidos en el estudio (Tabla 13). La diferencia más llamativa es que prácticamente la totalidad de estos pacientes (96,4%) fueron diagnosticados en estadio IV; esto no es de extrañar, teniendo en cuenta que irinotecan se utiliza fundamentalmente en estadios avanzados de la enfermedad. Los porcentajes de pacientes que recibieron 5-FU o capecitabina en combinación con irinotecan (51,8 y 39,3%, respectivamente) fueron bastante similares a los porcentajes en la población que recibió esquemas basados en oxaliplatino (58,5 y 37,7%, respectivamente) (Tablas 39 y 44). Los anticuerpos monoclonales bevacizumab, cetuximab y panitumumab se combinaron más frecuentemente con irinotecan (67,9%, 23,2% y 1,8%) que con oxaliplatino (27,4%, 9,4% y 0,9%). Sin embargo, esto se debe directamente al hecho de que estos anticuerpos son más utilizados en pacientes de CCR metastásico e indirectamente al mayor empleo de irinotecan en estos pacientes.

#### 4.7.2.- Polimorfismos analizados

Se analizaron los mismos polimorfismos y CNV que en el subanálisis de oxaliplatino (Tabla 40).

#### 4.7.3.- Reacciones adversas a irinotecan. Análisis estadístico

Al igual que en el análisis de oxaliplatino, los pacientes fueron agrupados en función del grado de toxicidad; se consideraron efectos adversos severos aquéllos con grado  $\geq 3$ , excepto SMP, en el cual se consideró severo un grado  $\geq 2$ . En la Figura 30 se representa la frecuencia de los efectos adversos severos desarrollados por los pacientes.

Las reacciones adversas más comunes fueron neutropenia (16,1%), diarrea (16,1%), RCA (10,7%) y astenia (10,7%). No hubo ningún paciente que desarrollara plaquetopenia, neuropatía periférica ni reacción alérgica grado  $> 2$  al tratamiento. En este caso, un 69,6% de los pacientes requirió reducción de alguna de las dosis de fármaco o retraso de alguno de los ciclos por aparición de toxicidad.

Figura 30. Reacciones adversas severas (grado  $\geq 3$ ) desarrolladas por los pacientes tratados con regímenes basados en irinotecan. Se consideró síndrome mano-pie severo cuando el grado fue  $\geq 2$ .

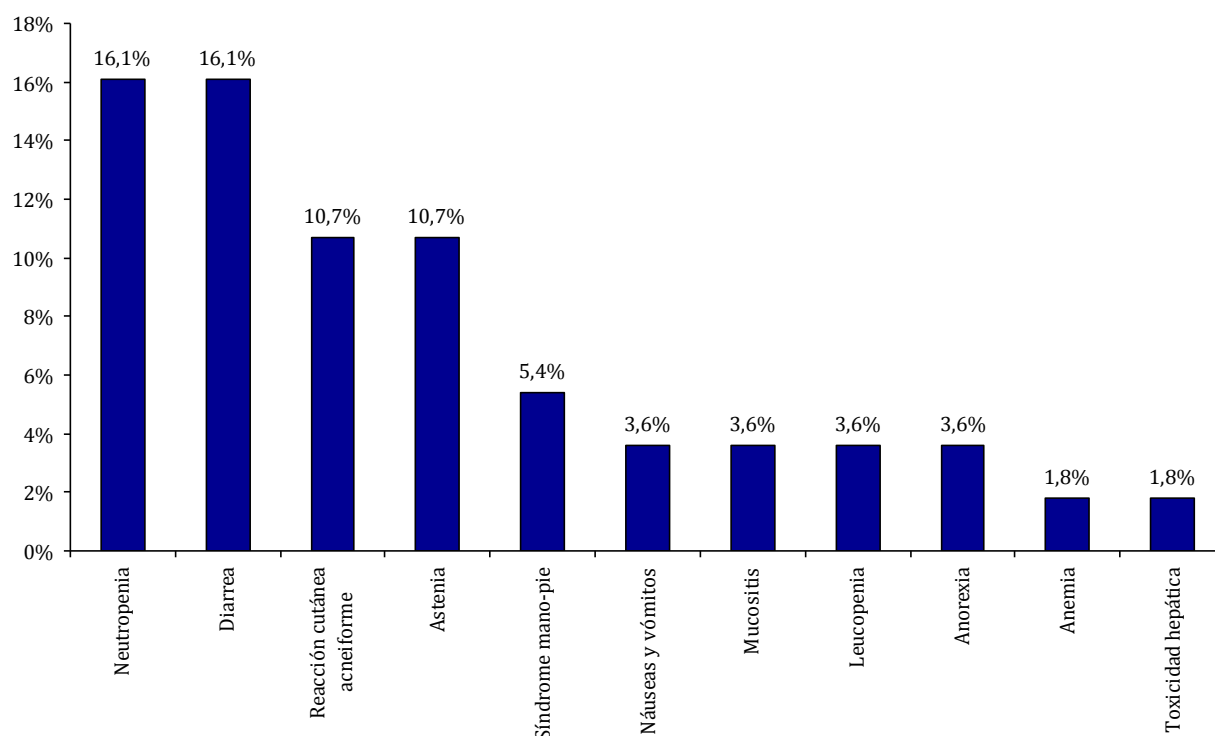


Tabla 45. Comparación de efectos adversos severos (grado  $\geq 3$ ) en la población de pacientes que recibieron regímenes basados en oxaliplatino e irinotecan. Se consideró síndrome mano-pie severo cuando el grado fue  $\geq 2$ .

Reacción adversa grado 3/4	Oxaliplatino [n (%)]	Irinotecan [n (%)]
<b>Toxicidad gastrointestinal</b>		
Náuseas y vómitos	5 (4,7%)	2 (3,6%)
Diarrea	18 (17%)	9 (16,1%)
Mucositis	3 (2,8%)	2 (3,6%)
<b>Toxicidad hematológica</b>		
Anemia	0 (0%)	1 (1,8%)
Neutropenia	21 (19,8%)	9 (16,1%)
Leucopenia	3 (2,8%)	2 (3,6%)
Plaquetopenia	2 (1,9%)	0 (0%)
<b>Otras toxicidades</b>		
Neuropatía periférica	13 (12,3%)	0 (0%)
Reacción alérgica	3 (2,8%)	0 (0%)
Toxicidad hepática	5 (4,7%)	1 (1,8%)
Astenia	13 (12,3%)	6 (10,7%)
Anorexia	3 (2,8%)	2 (3,6%)
RCA	4 (3,8%)	6 (10,7%)
SMP	12 (11,3%)	3 (5,4%)

RCA, reacción cutánea acneiforme; SMP, síndrome mano-pie.

La comparación de los efectos adversos en el grupo de pacientes tratados con esquemas basados en oxaliplatino con los basados en irinotecan (Tabla 45) revela que las proporciones, tanto de reacciones adversas gastrointestinales como hematológicas, fueron similares, aunque los esquemas basados en oxaliplatino fueron ligeramente más tóxicos ( $p > 0,05$ ). Ningún paciente en la población tratada con esquemas basados en irinotecan desarrolló neuropatía periférica ni reacción alérgica severas en comparación con el 12,3% y 2,8%, respectivamente, de los pacientes que recibieron oxaliplatino (Tabla 45). La RCA fue más frecuente en los regímenes basados en irinotecan que en los que contenían oxaliplatino (10,7% y 3,8%, respectivamente).

Se encontraron ocho asociaciones estadísticamente significativas entre las variaciones genéticas estudiadas y las reacciones adversas al tratamiento con irinotecan (Tabla 46): *ABCB1* C1236T con astenia ( $p = 0,002$ ) y SMP ( $p = 0,013$ ); *ABCB1* G2677T/A con astenia ( $p = 0,021$ ); *ABCB1* C3435T con diarrea ( $p = 0,010$ ) y SMP ( $p = 0,032$ ); *ERCC1* Asn118Asn con mucositis ( $p = 0,014$ ), *ERCC2* Lys751Gln con diarrea ( $p = 0,033$ ) y CNV del gen *GSTT1* con astenia ( $p = 0,010$ ).

Tabla 46. Valores de p para las asociaciones entre los polimorfismos estudiados y reacciones adversas severas (grado  $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos que contienen irinotecan. Se consideró síndrome mano-pie severo cuando el grado fue  $\geq 2$ . Se resaltan en rojo aquellos valores de p estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

	<i>UGT1A1</i> *28	<i>UGT1A1</i> *93	<i>ABCB1</i> C1236T	<i>ABCB1</i> G2677T/A	<i>ABCB1</i> C3435T	<i>XRCC1</i> Gln399Arg	<i>ERCC1</i> Asn118Asn	<i>ERCC2</i> Lys751Gln	<i>GSTP1</i> Ile105Val	<i>GSTT1</i> CNV	<i>EGFR</i> intrón(CA) <sub>n</sub>
Náuseas/ vómitos	1	1	0,373	0,179	0,131	0,322	1	0,577	0,605	0,205	1
Diarrea	0,535	0,342	0,623	0,098	<b>0,010</b>	0,448	0,277	<b>0,033</b>	1	0,703	0,458
Mucositis	1	1	0,127	0,358	0,342	1	<b>0,014</b>	0,084	1	1	0,150
Anemia	0,518	1	1	1	1	0,143	1	1	1	1	0,393
Neutropenia	0,535	0,752	0,136	0,098	0,620	0,304	0,277	1	0,169	1	0,731
Leucopenia	1	0,537	0,636	0,358	0,342	0,626	1	1	0,605	1	0,150
RCA	0,454	0,710	0,565	1	0,773	0,552	1	1	0,507	0,601	1
Toxicidad hepática	1	0,446	1	1	1	1	0,125	0,446	1	1	1
Astenia	0,126	0,257	<b>0,002</b>	<b>0,021</b>	0,067	0,227	1	1	0,507	<b>0,010</b>	0,198
Anorexia	0,264	0,537	0,059	0,179	0,640	0,322	1	0,557	1	0,205	0,150
SMP	0,633	1	<b>0,013</b>	0,056	<b>0,032</b>	1	0,394	1	1	0,205	1
Retraso/ reducción	0,450	0,800	0,321	0,084	0,164	0,222	0,830	0,470	0,269	1	0,554

RCA, reacción cutánea-acneiforme; SMP, síndrome mano-pie.

La tabla de contingencia (Tabla 47) detalla las frecuencias de cada genotipo estudiado y los efectos adversos significativos.

Tabla 47. Tablas de contingencia con las asociaciones estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre variaciones genéticas y reacciones adversas severas (grado  $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en irinotecan. Se consideró síndrome mano-pie severo cuando el grado fue  $\geq 2$ .

Gen (identificación de SNP)	Genotipo	n (%)	Grado de toxicidad [n(%)]		p	Reacción adversa
			0-2	3-4		
<b>ABCB1 (C1236T)</b>	CC	14 (25%)	9 (64,3%)	5 (35,7%)	<b>0,002</b>	<b>Astenia</b>
	CT	27 (48,2%)	26 (96,3%)	1 (3,7%)		
	TT	15 (28,8%)	15 (100%)	0 (0%)		
	CC	14 (25%)	11 (78,6%)	3 (21,4%)	<b>0,013</b>	<b>SMP</b>
	CT	27 (48,2%)	27 (100%)	0 (0%)		
	TT	15 (28,8%)	15 (100%)	0 (0%)		
<b>ABCB1 (G2677T/A)</b>	GG	21 (37,5%)	16 (76,2%)	5 (23,8%)	<b>0,021</b>	<b>Astenia</b>
	GT/A	23 (41,1%)	22 (95,7%)	1 (4,3%)		
	TT	12 (21,4%)	12 (100%)	0 (0%)		
<b>ABCB1 (C3435T)</b>	CC	17 (30,4%)	11 (64,7%)	6 (35,3%)	<b>0,010</b>	<b>Diarrea</b>
	CT	27 (48,2%)	24 (88,9%)	3 (11,1%)		
	TT	12 (21,4%)	12 (100%)	0 (0%)		
	CC	17 (30,4%)	14 (82,4%)	3 (17,6%)	<b>0,032</b>	<b>SMP</b>
	CT	27 (48,2%)	27 (100%)	0 (0%)		
	TT	12 (21,4%)	12 (100%)	0 (0%)		
<b>ERCC1 (Asn118Asn)</b>	TT	21 (37,5%)	21 (100%)	0 (0%)	<b>0,014</b>	<b>Mucositis</b>
	CT	28 (50%)	28 (100%)	0 (0%)		
	CC	7 (12,5%)	5 (71,4%)	2 (28,6%)		
<b>ERCC2 (Lys751Gln)</b>	AA	21 (37,5%)	20 (95,2%)	1 (4,8%)	<b>0,033</b>	<b>Diarrea</b>
	CA	31 (55,4%)	25 (80,6%)	6 (19,4%)		
	CC	4 (7,1%)	2 (50%)	2 (50%)		
<b>GSTT1 (CNV)</b>	0	4 (7,1%)	2 (50%)	2 (50%)	<b>0,010</b>	<b>Astenia</b>
	1	2 (3,6%)	1 (50%)	1 (50%)		
	2	50 (89,3%)	47 (94%)	3 (6%)		

SMP, síndrome mano-pie.

Las variantes estudiadas del gen *ABCB1* también resultaron relevantes en este análisis. Al igual que en el estudio con pacientes tratados con capecitabina, la variante T de cualquiera de los polimorfismos de *ABCB1* resultó protectora frente a reacciones adversas severas: astenia (C1236T, G2677T/A), SMP (C1236T, C3435T) y diarrea (C3435T) (Tabla 47). De esta manera, los individuos homocigotos para el alelo 1236C presentaron mayor probabilidad de desarrollar astenia (35,7%) y SMP (21,4%) que los individuos heterocigotos (3,7% y 0%, respectivamente) y homocigotos para 1236T (0% en ambos casos). Los pacientes con dos alelos *ABCB1* 2677T sufrieron menos astenia (0%) que los que tenían uno (4,3%) o ninguno (23,8%). En lo que respecta a la variante C3435T, los pacientes homocigotos TT presentaron menor probabilidad de sufrir diarrea y SMP severos (0% en ambos casos) que los heterocigotos CT (11,1% y 0%, respectivamente) y que los homocigotos CC (35,3% y 17,6%, respectivamente).

El SMP es el efecto adverso más característico del tratamiento con capecitabina. Se decidió por ello excluir a los pacientes tratados con este fármaco asociado a irinotecan (39,3% de los pacientes), para saber si las asociaciones obtenidas entre *ABCB1* C1236T y C3435T con SMP severo eran resultado de la presencia de capecitabina en el régimen. No hubo ningún paciente en la muestra resultante que desarrollara SMP severo a lo largo del tratamiento, con lo que se puede concluir que la asociación se debía a la presencia de la fluoropirimidina dentro del esquema quimioterápico. Con respecto a la asociación obtenida entre *ABCB1* C3435T y diarrea, en este caso se decidió excluir los pacientes tratados con 5-FU combinado con irinotecan, con el objetivo de analizar si la asociación estaba siendo afectada por la presencia de la fluoropirimidina. Pese al bajo tamaño de la muestra resultante (27 pacientes), la asociación se mantuvo estadísticamente significativa (Tabla 48).

Tabla 48. Tabla de contingencia con la asociación entre *ABCB1* C3435T y diarrea severa (grado  $\geq 3$ ) en pacientes tratados con regímenes basados en irinotecan excluyendo combinaciones con 5-FU.

Genotipos <i>ABCB1</i> C3435T	Tratamiento basado en irinotecan (excluido 5-FU)			p
	n (%)	Diarrea [n (%)]		
		0-2	3-4	
CC	9 (33,4%)	5 (55,6%)	4 (44,4%)	0,039
CT	11 (40,7%)	9 (81,8%)	2 (18,2%)	
TT	7 (25,9%)	7 (100%)	0 (0%)	

Por otro lado, el 28,6% de los pacientes homocigotos para el alelo C del polimorfismo Asn118Asn del gen *ERCC1* presentó mucositis severa en comparación con el 0% de los pacientes con los genotipos CT y TT (Tabla 47).

El polimorfismo Lys751Gln del gen *ERCC2* fue asociado con diarrea pero, al contrario que en el caso del oxaliplatino, los pacientes homocigotos para la variante C de este SNP presentaron mayor toxicidad (50%) que los pacientes heterocigotos CA (19,4%) y homocigotos para el alelo A (4,8%) (Tabla 47).

Los resultados muestran también cómo la presencia de dos copias en el gen *GSTT1* disminuye la probabilidad de padecer astenia severa (6%), en comparación con la presencia de una o ninguna copia de este gen (50% en ambos casos) (Tabla 47).

Cuando estas ocho asociaciones fueron sometidas a una regresión logística, incluyendo el sexo y PS como covariables, tres de éstas fueron confirmadas en el grupo de pacientes que recibieron irinotecan: *ABCB1* C1236T y *GSTT1* CNV con astenia y *ABCB1* C3435T con diarrea (Tabla 49).

Tabla 49. Regresión logística con las asociaciones que se mantuvieron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre polimorfismos y reacciones adversas severas (grado  $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en irinotecan.

Variable	OR	95% IC	p
<b>Astenia</b>			
<b><i>ABCB1</i> (C1236T)</b>			
CT vs. CC	0,074	0,007 a 0,769	<b>0,029</b>
CT/TT vs. CC	0,043	0,004 a 0,444	<b>0,008</b>
<b><i>GSTT1</i> (CNV)</b>			
2 copia vs. 0	0,046	0,003 a 0,685	<b>0,025</b>
2 copias vs. 0/1	0,074	0,009 a 0,617	<b>0,016</b>
<b>Diarrea</b>			
<b><i>ABCB1</i> (C3435T)</b>			
CT/TT vs. CC	0,162	0,031 a 0,844	<b>0,031</b>

OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza.

#### 4.8.- Identificación de polimorfismos genéticos asociados a reacciones adversas al tratamiento en adyuvancia con FOLFOX o XELOX en pacientes de CCR

##### 4.8.1.- Características basales de los pacientes

Finalmente, se decidió hacer un estudio con pacientes que tuvieran un tratamiento más homogéneo. Principalmente a causa del mayor número de pacientes, se eligieron aquellos que estuvieran libres de enfermedad y que hubieran sido tratados con los esquemas FOLFOX o XELOX. Se obtuvieron 47 pacientes con estas características clínicas (Tabla 50).

Tabla 50. Características basales de los pacientes tratados con FOLFOX/XELOX en adyuvancia.

Parámetro	n (%)	
<b>Pacientes</b>		
	Hombres	37 (78,7%)
	Mujeres	10 (21,3%)
	Total	47 (100%)
<b>Edad (años) mediana (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>	71 (57-76)	
<b>ECOG PS</b>		
	0	34 (72,3%)
	1	13 (27,7%)
<b>Tipo de cáncer</b>		
	Colon	33 (70,2%)
	Recto	14 (29,8%)
<b>Tiempo de evolución (años) mediana (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>	3 (2-4)	
<b>Grado del tumor</b>		
	II	13 (27,7%)
	III	23 (48,9%)
	IV	11 (23,4%)
<b>Tratamiento previo</b>		
	Cirugía	41 (87,2%)
	Cirugía + Radioterapia	6 (12,8%)
<b>Otros fármacos</b>		
	FOLFOX	23 (48,9%)
	XELOX	24 (51,1%)

ECOG PS, *Eastern Cooperative Oncology Group performance status*.



En este último caso, al restringir el análisis a tratamientos en adyuvancia, una mayor proporción de pacientes tenían un PS de 0 en el momento del diagnóstico (72,3%), es decir, tenían un mejor estado general, y el cáncer había sido detectado en un estadio más temprano en comparación con los análisis anteriores. Como era de esperar, la totalidad de estos pacientes habían recibido cirugía como tratamiento previo, asociada o no a radioterapia. Las proporciones de pacientes que recibieron FOLFOX y XELOX estaban equilibradas (48,9% y 51,1%, respectivamente). Llama la atención el desequilibrio entre hombres y mujeres (78,7% vs. 21,3%).

#### 4.8.2.- Polimorfismos analizados

Se incluyeron 17 SNPs y un CNV en 13 genes relacionados con la farmacocinética y dinámica de fluoropirimidinas y oxaliplatino, al ser éstos los fármacos utilizados en los esquemas FOLFOX y XELOX (Tabla 51).

Tabla 51. Polimorfismos/CNV analizados en pacientes tratados con FOLFOX/XELOX en adyuvancia.

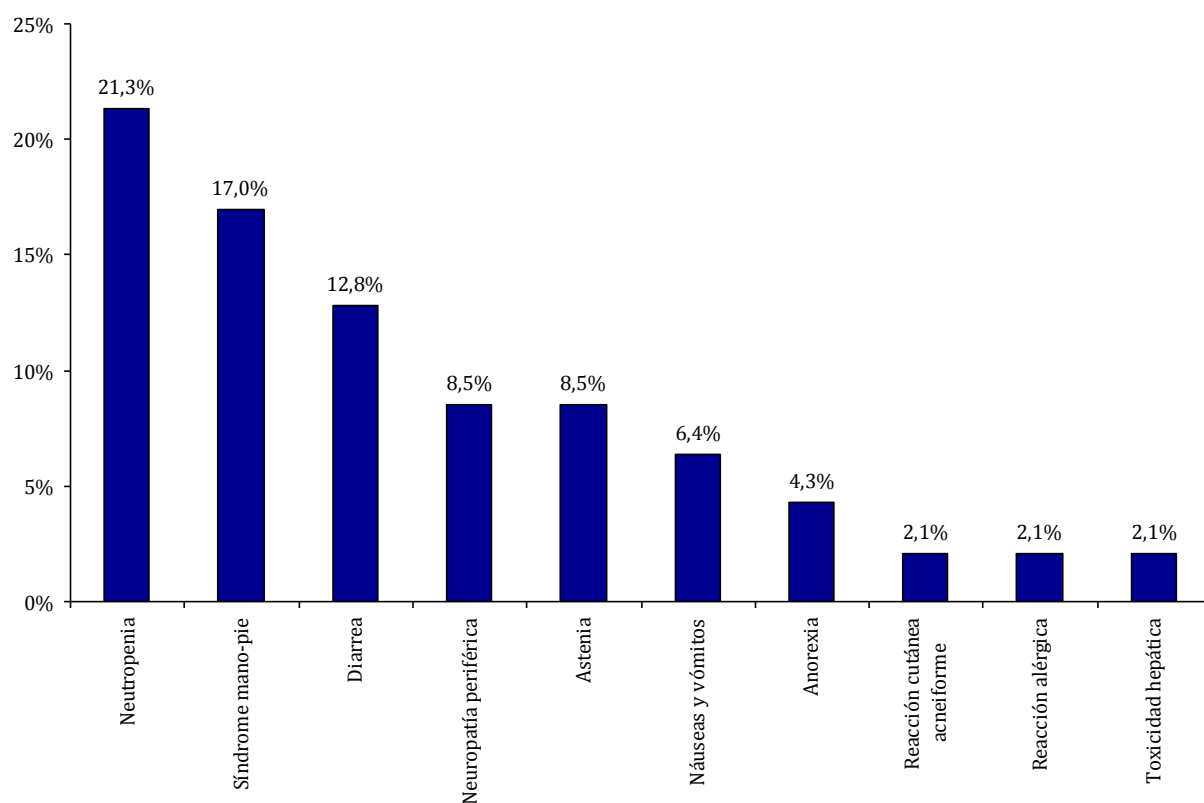
Gen	Polimorfismo/CNV	
	Identificación rs (dbSNP)	Identificación en el texto de esta memoria
<b>Fluoropirimidinas</b>		
<b>DPYD</b>	rs2297595	DPYD A496G
<b>TYMS</b>	rs34489327	TYMS 6del
	rs34743033	TYMS USF E-box
<b>MTHFR</b>	rs1801133	MTHFR C677T
	rs1801131	MTHFR A1298C
<b>ABCC4</b>	rs4148551	ABCC4 A311G
	rs3742106	ABCC4 T38G
<b>ABCC5</b>	rs3805114	ABCC5 A1366C
<b>CDA</b>	rs2072671	CDA Lys27Gln
<b>ABCB1</b>	rs1128503	ABCB1 C1236T
	rs2032582	ABCB1 G2677T/A
	rs1045642	ABCB1 C3435T
<b>Oxaliplatino</b>		
<b>XRCC1</b>	rs25487	XRCC1 Gln399Arg
<b>ERCC1</b>	rs11615	ERCC1 Asn118Asn
<b>ERCC2</b>	rs13181	ERCC2 Lys751Gln
<b>GSTP1</b>	rs1695	GSTP1 Ile105Val
<b>GSTT1</b>	NA	GSTT1 CNV
<b>EGFR</b>	rs45559542	EGFR intrón 1 (CA) <sub>n</sub>

CNV, variación del número de copias; dbSNP, *Single Nucleotide Polymorphism database*; NA, no aplica.

#### 4.8.3.- Reacciones adversas a FOLFOX/XELOX en adyuvancia. Análisis estadístico

Las reacciones adversas severas al tratamiento adyuvante con FOLFOX o XELOX más comunes fueron neutropenia (21,3%), SMP (17%), diarrea (12,8%), neuropatía periférica (8,5%) y astenia (8,5%) (Figura 31). No hubo ningún paciente que desarrollara mucositis, anemia, plaquetopenia ni leucopenia grado > 2 al tratamiento. Un 70,2% de los pacientes tratados con estos regímenes en adyuvancia sufrieron retrasos o reducciones de dosis a lo largo del tratamiento.

Figura 31. Reacciones adversas severas (grado  $\geq 3$ ) desarrolladas por los pacientes tratados con los esquemas FOLFOX/XELOX en adyuvancia. Se consideró síndrome mano-pie severo cuando el grado fue  $\geq 2$ .



Se realizó un estudio de asociación entre variaciones genéticas y las reacciones adversas severas al tratamiento adyuvante con FOLFOX o XELOX. Para ello se utilizó el test  $\chi^2$  con el estadístico exacto de Fisher. Los valores de p obtenidos en este análisis se muestran en la Tabla 52.

Tabla 52. Valores de p para las asociaciones entre los polimorfismos estudiados y reacciones adversas severas (grado  $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con regímenes FOLFOX/XELOX en adyuvancia. Se consideró síndrome mano-pie severo cuando el grado fue  $\geq 2$ . Se resaltan en rojo aquellos valores de p estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ).

	Diarrea	Neutropenia	Neuropatía	SMP	Astenia	Náuseas/ vómitos	Anorexia	RCA	Reacción alérgica	Toxicidad hepática	Retraso/ reducción
<b>DPYD A496G</b>	1	0,63	0,612	0,329	1	0,054	0,278	1	1	0,149	0,42
<b>TYMS 6del</b>	0,481	0,565	0,084	0,367	1	<b>0,047</b>	0,553	1	0,553	1	0,066
<b>TYMS USF E-BOX</b>	0,746	0,078	0,700	0,773	1	<b>0,028</b>	0,222	1	0,383	0,383	0,442
<b>MTHFR C677T</b>	0,365	0,804	0,723	0,176	0,149	1	1	0,15	1	1	0,824
<b>MTHFR A1298C</b>	1	0,13	0,455	0,575	0,717	0,671	1	0,55	1	1	0,491
<b>ABCC4 A311G</b>	1	0,228	1	1	1	0,141	1	1	1	0,362	0,413
<b>ABCC4 T38G</b>	1	0,363	1	1	1	0,139	1	1	1	0,383	0,415
<b>ABCC5 A1366C</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0,208
<b>CDA Lys27Gln</b>	0,549	0,612	0,495	0,269	0,711	0,717	0,625	1	1	0,681	<b>0,038</b>
<b>ABCB1 C1236T</b>	0,346	1	1	0,776	0,458	0,663	1	0,13	0,511	0,128	1
<b>ABCB1 G2677T/A</b>	0,743	0,595	0,432	0,561	0,71	1	1	0,11	0,532	1	1
<b>ABCB1 C3435T</b>	0,511	1	1	0,373	0,688	0,663	1	0,13	1	1	0,807
<b>XRCC1 Gln399Arg</b>	0,565	0,48	1	0,799	0,733	0,705	0,35	1	1	1	0,212
<b>ERCC1 Asn118Asn</b>	0,774	<b>0,015</b>	0,739	0,445	1	0,72	0,667	1	1	0,574	1
<b>ERCC2 Lys751Gln</b>	1	0,107	1	1	0,71	0,084	0,287	1	1	0,532	0,817
<b>GSTP1 Ile105Val</b>	0,202	0,286	0,72	0,57	1	0,663	1	0,11	0,553	0,553	0,639
<b>GSTT1 CNV</b>	0,604	0,478	0,936	0,504	0,308	0,947	0,204	1	1	1	0,871
<b>EGFR intrón(CA)<sub>n</sub></b>	1	0,734	0,617	0,715	1	1	0,495	0,45	0,447	0,447	1

SMP, síndrome mano-pie; RCA, reacción cutánea-acneiforme.

Se encontraron cuatro asociaciones estadísticamente significativas: *TYMS* 6del y USF E-box con náuseas y vómitos ( $p = 0,047$  y  $0,028$ , respectivamente), *CDA* Lys27Gln con retraso o reducción de dosis ( $p = 0,038$ ) y *ERCC1* Asn118Asn con neutropenia ( $p = 0,015$ ); y una asociación muy cercana a la significación estadística: *DPYD* A496G con náuseas y vómitos ( $p = 0,054$ ).

La tabla de contingencia (Tabla 53) detalla, por genotipo y efecto adverso severo, los porcentajes de pacientes para estas asociaciones.

Tabla 53. Tablas de contingencia con las asociaciones estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) (\* o cercanas a la significación estadística) entre polimorfismos y reacciones adversas severas (grado  $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con FOLFOX/XELOX en adyuvancia.

Gen (identificación de SNP)	Genotipo	n (%)	Grado de toxicidad [n(%)]		p	Reacción adversa
			0-2	3-4		
<b><i>DPYD</i> (A496G)</b>	AA	40 (85,1%)	39 (97,5%)	1 (2,5%)	0,054*	<b>Náuseas y vómitos</b>
	GA	7 (14,9%)	5 (71,4%)	2 (28,6%)		
<b><i>TYMS</i> (6del)</b>	WT/WT	23 (48,9%)	23 (100%)	0 (0%)	<b>0,047</b>	<b>Náuseas y vómitos</b>
	del/WT	21 (44,7%)	19 (90,5%)	2 (9,5%)		
	del/del	3 (6,4%)	2 (66,7%)	1 (33,3%)		
<b><i>TYMS</i> (USF E-box)</b>	2 sitios USF E-box	29 (61,7%)	29 (100%)	0 (0%)	<b>0,028</b>	<b>Náuseas y vómitos</b>
	3 sitios USF E-box	15 (31,9%)	13 (86,7%)	2 (13,3%)		
	4 sitios USF E-box	3 (6,4%)	2 (66,7%)	1 (33,3%)		
<b><i>CDA</i> (Lys27Gln)</b>	AA	27 (57%)	5 (18,5%)	22 (81,5%)	<b>0,038</b>	<b>Retraso/ reducción</b>
	AC	15 (32%)	6 (40%)	9 (60%)		
	CC	5 (11%)	3 (60%)	2 (40%)		
<b><i>ERCC1</i> (Asn118Asn)</b>	TT	17 (36,2%)	16 (94,1%)	1 (5,9%)	<b>0,015</b>	<b>Neutropenia</b>
	CT	20 (42,6%)	16 (80%)	4 (20%)		
	CC	10 (21,3%)	5 (50%)	5 (50%)		

La delección de 6 pb en la región 3'-UTR y la presencia de 4 puntos de unión en la región promotora del gen *TYMS* se asoció con riesgo de náuseas y vómitos severos, de manera que la ausencia de delección en la región 3' y la presencia de un menor número de puntos de unión al factor de transcripción del gen *TYMS* dio lugar a un menor riesgo de sufrir náuseas y vómitos a lo largo del tratamiento (Tabla 53). Los pacientes heterocigotos GA para *DPYD* A496G mostraron un mayor riesgo de padecer este mismo efecto adverso en comparación

con los homocigotos para el alelo A, aunque esta asociación no resultó estadísticamente significativa ( $p = 0,054$ ).

El polimorfismo Lys27Gln del gen *CDA* se asoció a retraso o reducción de dosis. Los resultados del análisis muestran cómo los pacientes homocigotos para el alelo A tuvieron mayor probabilidad de sufrir retrasos en las administraciones del tratamiento o reducciones de dosis por toxicidad (81,5%) que los pacientes heterocigotos AC (60%) u homocigotos CC (40%) (Tabla 53). Sin embargo, no se obtuvo ninguna asociación estadísticamente significativa entre este polimorfismo y efectos adversos.

Finalmente, los pacientes homocigotos para la variante T del polimorfismo Asn118Asn en *ERCC1* presentaron menor probabilidad de desarrollar neutropenia severa (5,9%) que los pacientes con los genotipos CT y CC (20 y 50%, respectivamente) (Tabla 53).

El análisis por regresión logística reveló que tres de las cinco asociaciones anteriores se mantuvieron estadísticamente significativas: *DPYD* A496G con náuseas y vómitos, *CDA* Lys27Gln con retraso o reducción de dosis y *ERCC1* Asn118Asn con neutropenia (Tabla 54).

Tabla 54. Regresión logística con las asociaciones que se mantuvieron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre polimorfismos y reacciones adversas severas (grado  $\geq 3$ ) en el grupo de pacientes tratados con FOLFOX/XELOX en adyuvancia.

Variable	OR	95% IC	p
<b>Náuseas y vómitos</b>			
<b><i>DPYD</i> (A496G)</b>			
AA vs. GA	0,051	0,003 a 0,772	<b>0,032</b>
<b>Retraso o reducción</b>			
<b><i>CDA</i> (Lys27Gln)</b>			
AC/CC vs. AA	0,225	0,056 a 0,913	<b>0,037</b>
<b>Neutropenia</b>			
<b><i>ERCC1</i> (Asn118Asn)</b>			
TT vs. CC	0,047	0,004 a 0,597	<b>0,018</b>
CT/TT vs. CC	0,099	0,016 a 0,615	<b>0,013</b>

OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza.

Aquellos individuos homocigotos para el alelo A en *DPYD* A496G presentaron un menor riesgo de desarrollar náuseas y vómitos severos que los heterocigotos para esta variante (OR: 0,051; 95% IC: 0,003-0,772;  $p = 0,032$ ) (Tabla 54).

Los pacientes portadores del alelo C para el polimorfismo Lys27Gln en *CDA* presentaron un menor riesgo de sufrir reducción o retraso de dosis que los homocigotos AA (OR: 0,225; 95% IC: 0,056-0,913;  $p = 0,037$ ) (Tabla 54).

Por último, los pacientes homocigotos TT para el polimorfismo Asn118Asn de *ERCC1* mostraron un menor riesgo de desarrollar neutropenia severa que los homocigotos CC (OR: 0,047; 95% IC: 0,004-0,597;  $p = 0,018$ ) (Tabla 54). Esta significación estadística se mantuvo cuando se compararon los homocigotos para el alelo C con el resto (OR: 0,099; 95% IC: 0,016-0,615;  $p = 0,013$ ).



## **5.- DISCUSIÓN**





Los resultados obtenidos en este trabajo identifican en una cohorte de pacientes del HGUGM variaciones genéticas asociadas a reacciones adversas al tratamiento con fluoropirimidinas, oxaliplatino e irinotecan. Estos resultados preliminares, que deberán ser confirmados en una población con un mayor número de pacientes, podrían ser de gran ayuda para el oncólogo, quien tendría una herramienta útil para ofrecer el tratamiento con menor probabilidad de producir reacciones adversas severas, en función de determinadas variantes genéticas en pacientes de CCR. De hecho, ya se han propuesto métodos con terapia dirigida conforme al genotipo para incrementar la respuesta y/o reducir la toxicidad frente a 5-FU<sup>182</sup> o irinotecan<sup>183,184</sup>. En el trabajo que se presenta en esta memoria se muestran además las frecuencias de variantes genéticas en la población de pacientes tratados en el HGUGM potencialmente relevantes para la farmacogenética del CCR y que pueden ser de utilidad y servir de referencia para estudios posteriores.

Poder predecir qué pacientes van a responder a la terapia o cuáles van a desarrollar efectos adversos severos a la misma es el objetivo principal de la farmacogenética. Los estudios sobre marcadores farmacogenéticos de toxicidad son más complicados de comparar entre sí que los estudios que analizan la eficacia, ya que variables como supervivencia libre de enfermedad o de progresión y supervivencia global están perfectamente definidas y no dan lugar a diferentes interpretaciones. A pesar de que la farmacogenética en CCR es una de las más estudiadas, la dificultad de descubrir biomarcadores farmacogenéticos de toxicidad es importante. Basta considerar que pocos biomarcadores para fármacos oncológicos aprobados por la FDA están asociados a toxicidad, y que de ellos sólo dos tienen aplicabilidad en la quimioterapia utilizada en CCR: *DPYD*\*2A para capecitabina y 5-FU, y *UGT1A1*\*28 para irinotecan<sup>117</sup>. Por su parte, la EMA también menciona la variante *UGT1A1*\*28 en la ficha técnica de irinotecan, y advierte en las de capecitabina y 5-FU de que pacientes con una deficiencia probada de *DPYD* no deben ser tratados con estos fármacos<sup>32,118,185</sup>. Además, a efectos prácticos estos dos marcadores apenas están implantados en la práctica clínica habitual del manejo de pacientes de CCR.

Existen diferentes factores que explicarían la dificultad para encontrar asociaciones claras entre variaciones genéticas y efectos adversos a fármacos<sup>173</sup>:

- Diferentes criterios para la gradación de efectos adversos: algunos estudios utilizan los criterios de la CTCAE, ahora en la versión 3.0<sup>170</sup>, mientras que otros utilizan la gradación según la Organización Mundial de la Salud<sup>186</sup>.
- Diferentes límites en la gradación para considerar toxicidad severa: las diferentes posibilidades que existen en la literatura son  $> 1$ <sup>187,188</sup>,  $> 2$ <sup>135</sup> ó  $> 3$ <sup>151</sup>. Este límite se complica si se tienen en cuenta además otros criterios como retrasos o reducciones de dosis<sup>63,109</sup>.
- Diferentes efectos adversos considerados en los distintos estudios; y es más, al ser la determinación de la eficacia el objetivo principal de muchos estudios, algunos hacen referencia sólo a “genotipos asociados o no con toxicidad”.

Resulta complicado por estas razones comparar resultados de farmacogenética de efectos adversos de la quimioterapia en general y de la administrada en CCR en particular<sup>173</sup>. El hecho de que la mayoría de los estudios se dirijan a analizar la eficacia hace que los protocolos de detección de asociaciones entre genotipo y respuesta raramente incluyan aspectos relacionados con efectos adversos a la quimioterapia.

Una proporción significativa de pacientes de CCR experimenta toxicidad severa frente al tratamiento quimioterápico, lo que conlleva en muchos casos retrasos o reducciones de dosis y, en otros casos, que la toxicidad pueda llegar a ser letal<sup>31</sup>. Pero no tiene que existir necesariamente una toxicidad severa para que el oncólogo decida reducir la dosis de quimioterapia o retrasar la administración de la misma; en muchas ocasiones, toxicidades moderadas persistentes en el tiempo o que afectan a la calidad de vida del paciente conducen a una reducción de dosis<sup>189</sup>. Este hecho complica enormemente los estudios de toxicidad y farmacogenética, ya que algunos pacientes (aquellos a quienes se les reduce la dosis de fármaco por haber desarrollado una toxicidad moderada), hubieran alcanzado probablemente toxicidad severa de haber continuado con su tratamiento inicial.

Por este motivo, en el presente trabajo se decidió estudiar las asociaciones de genotipos con efectos adversos tanto moderados-severos como severos en pacientes tratados con regímenes basados en 5-FU y capecitabina. El resultado mostró datos dispares y datos comunes. Por ejemplo, las claras asociaciones obtenidas entre los polimorfismos del gen *ABCB1* y los efectos adversos moderados-severos (neutropenia, SMP y RCA) al tratamiento que contenía capecitabina no fueron reproducidas cuando se consideraron los síntomas severos. De hecho, de las trece asociaciones encontradas cuando se analizaron los efectos adversos moderados-severos sólo una, *DPYD* A496G y náuseas y vómitos, fue reproducida al considerar la toxicidad severa. De la misma forma, la asociación encontrada entre *TYMS* 6del y náuseas y vómitos severos no fue reproducida en el análisis de reacciones adversas moderadas-severas. Se observan resultados similares al comparar las asociaciones encontradas en regímenes basados en 5-FU. Así, vemos cómo la delección de 6 pb en la región 3'-UTR de *TYMS* está asociada a neuropatía periférica, tanto severa como moderada-severa, mientras que el resto de asociaciones difieren entre ambos análisis.

Estos datos llevan a pensar que el criterio de corte en la gravedad del efecto adverso produce resultados diferentes, lo que puede deberse a dos hechos claramente diferenciados: por un lado, el número de pacientes en el presente trabajo no es elevado, de manera que, al considerar sólo los pacientes con efectos adversos severos, se obtiene un tamaño de muestra muy bajo para algunos genotipos, y este hecho puede dar lugar a alteraciones en la estadística; por otro lado, el hecho de que sea común en la práctica clínica reducir la dosis del tratamiento quimioterápico en pacientes que desarrollan efectos adversos grado 2 hace que el resultado esté sesgado y sea poco comparable. A la vista de los resultados obtenidos en los análisis de 5-FU y capecitabina y de estas consideraciones, no es posible deducir de una forma clara qué tipo de corte es el más adecuado, por lo que se decidió considerar sólo reacciones adversas severas en los análisis de oxaliplatino e irinotecan, por ser este tipo de análisis el más frecuente en la literatura.

Con respecto a las reacciones adversas de los fármacos empleados en la quimioterapia del CCR, comparten muchos de ellos la toxicidad hematológica y gastrointestinal, pero ciertos efectos adversos son específicos de determinados fármacos, como por ejemplo, la neuropatía periférica inducida por oxaliplatino o el SMP por capecitabina. Se ha demostrado que la variabilidad genética tiene una influencia importante en la toxicidad al

tratamiento quimioterápico en CCR, aparte de otros factores no genéticos como la disfunción de órganos y la presencia de comorbilidades<sup>63</sup>.

En el análisis de frecuencias genotípicas (Tabla 14), se puede ver que las frecuencias observadas fueron muy similares a las obtenidas en el proyecto HapMap para población caucásica, si bien es cierto que existen algunas diferencias, sobre todo en el caso de *TYMS* 6del y *ABCB1* C3435T. Estas discrepancias pueden ser debidas a que el término “caucásico” utilizado para la población HapMap engloba a población predominantemente del norte y oeste de Europa, a diferencia de la población de este estudio, que fue fundamentalmente de la península ibérica. Así, el trasfondo genético en la península ibérica está muy marcado por la influencia africana, e incluso se han observado diferencias entre distintas zonas de la península ibérica (sobre todo de norte a sur)<sup>190-193</sup>. Las frecuencias genotípicas observadas en el presente trabajo fueron bastante similares a las obtenidas en otros estudios con población española, tanto para *TYMS* 6del<sup>155</sup>, como para *ABCB1* C3435T<sup>194,195</sup>, lo que confirma la existencia de particularidades genéticas en la población de la península ibérica con respecto al resto de Europa. Resulta evidente la importancia que supone tener caracterizadas las frecuencias genotípicas de estas variantes en población española, ya que pueden servir de ayuda para estudios posteriores a la hora de seleccionar variantes genéticas y de calcular tamaños muestrales en estudios de farmacogenética en poblaciones con este origen. Pero se debe tener en cuenta que hoy en día las poblaciones están cada vez más mezcladas debido a los procesos de migración, lo que implica la necesidad de tenerlas bien caracterizadas en cuanto a su trasfondo genético.

Las asociaciones estadísticamente significativas entre reacciones adversas severas frente a esquemas quimioterápicos basados en oxaliplatino (náuseas y vómitos) o irinotecan (diarrea) y el SNP Lys751Gln en *ERCC2* deberían ser consideradas con precaución, ya que, tanto esta variante como *UGT1A1*\*93, no cumplieron el equilibrio de Hardy-Weinberg en la población de este estudio (Tabla 14). Se sabe que las desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg pueden deberse a errores de genotipado, estratificación o selección de poblaciones, y factores de confusión desconocidos<sup>196</sup>, y que además pueden conducir a la obtención de asociaciones falsas en estudios de casos y controles<sup>197</sup>. Sin embargo, el hecho de que las frecuencias genotípicas observadas para este polimorfismo fueran prácticamente idénticas a las obtenidas en la población caucásica HapMap (AA: 40,1% vs.

40,7%; CA: 52,6% vs. 52,2% y CC: 7,3% vs. 7,1%, respectivamente) y los controles realizados, descarta los errores de genotipado como una de las posibles causas que explicarían la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg.

En el estudio de ligamiento entre los polimorfismos localizados dentro de un mismo gen [C1236T (rs1128503), G2677T/A (rs2032582) y C3435T (rs1045642) en *ABCB1*; A1298C (rs1801131) y C677T (rs1801133) en *MTHFR*; T38G (rs3742106) y A311G (rs4148551) en *ABCC4*; VNTR (rs34743033) y 6del (rs34489327) en *TYMS*; y \*28 (rs8175347) y \*93 (rs10929302) en *UGT1A1*], se encontró un alto LD en todos ellos (Tabla 15). Sin embargo, el hecho de no cumplir las frecuencias genotípicas observadas para la variante *UGT1A1*\*93 el equilibrio de Hardy-Weinberg hizo que los valores de LD obtenidos para los dos SNPs analizados en *UGT1A1* no fueran del todo fiables. No obstante, otros autores también han obtenido valores altos de LD para las variantes analizadas en *UGT1A1*<sup>160</sup>, además de *ABCB1*<sup>174</sup>, *TYMS*<sup>137,198,199</sup>, *MTHFR*<sup>137,199</sup>.

Como parte de la preparación de esta memoria se llevó a cabo un exhaustivo trabajo de revisión de los estudios que existen en la literatura sobre farmacogenética y reacciones adversas al tratamiento quimioterápico en CCR, que fue publicado en la revista *Pharmacogenomics* (Anexo 3).

A continuación se discutirán los resultados obtenidos, estructurándolos de acuerdo a las variantes genéticas analizadas en este trabajo que podrían influir en la respuesta a tratamientos basados en fluoropirimidinas, oxaliplatino e irinotecan.

### 5.1.- Farmacogenética de reacciones adversas frente a fluoropirimidinas

La capecitabina es un profármaco de 5-FU, pero su perfil de toxicidad es algo diferente al que presenta éste. Mientras la toxicidad hematológica (leucopenia, trombocitopenia y neutropenia) se asocia más al 5-FU, otros efectos adversos como diarrea, náuseas y vómitos, y SMP son más frecuentes en regímenes basados en capecitabina<sup>70</sup>. Estas observaciones coinciden con los resultados del presente trabajo: la neutropenia fue más frecuente en los esquemas basados en 5-FU, mientras que una mayor proporción de pacientes desarrollaron diarrea y SMP durante tratamientos que contenían capecitabina (Tabla 28). Sin embargo, muchos de los análisis farmacogenéticos que existen en la literatura mezclan pacientes tratados con estos dos fármacos, con lo que pierden información relevante para la asociación de toxicidad con el fármaco específico<sup>109</sup>. Según nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se identifican en un mismo estudio farmacogenético marcadores de toxicidad diferenciales a las dos fluoropirimidinas más frecuentemente utilizadas, 5-FU y capecitabina, y que sirven de base para la mayor parte de tratamientos quimioterápicos en CCR. Este hecho es de extraordinaria relevancia, ya que en la actualidad, los oncólogos carecen de criterios objetivos para una selección personalizada del tratamiento de inicio basado en 5-FU o capecitabina que minimice los efectos adversos asociados.

En cuanto a las reacciones adversas severas más frecuentes observadas en la población de pacientes tratados con esquemas basados en 5-FU (neutropenia 24%, astenia 18% y diarrea 10%), los porcentajes son muy superiores a los obtenidos por de Gramont y colaboradores (cols.) (neutropenia 1,9%, diarrea 2,9%), a pesar de que las dosis administradas coinciden<sup>66</sup>. Esto podría deberse a un efecto aditivo, ya que gran parte de la población de estudio del presente trabajo fue tratada con la combinación 5-FU/oxaliplatino (FOLFOX); esta hipótesis se ve confirmada al comparar las frecuencias de toxicidades con otros estudios que incluyeron pacientes tratados con el esquema FOLFOX, donde estas diferencias disminuyen<sup>181,200</sup>. Cuando se consideró el desarrollo de toxicidad por pacientes tratados con regímenes basados en capecitabina, la frecuencia observada de SMP severo (grado mayor o igual que 2 en este caso, 17,6%) fue similar a la obtenida en otro estudio encontrado en la literatura (15,5% de SMP grado mayor o igual que 2 frente a esquemas

XELOX)<sup>201</sup>. Los porcentajes de diarrea severa también fueron parecidos a los obtenidos por otros autores<sup>43,202</sup>.

En el estudio de asociación de variantes genéticas y reacciones adversas a la quimioterapia adyuvante con fluoropirimidinas y oxaliplatino se observó una gran diferencia en el porcentaje de hombres y mujeres (78,7% y 21,3%, respectivamente). Esta diferencia tan llamativa podría deberse al bajo tamaño de la muestra, aunque un estudio sueco también encontró discrepancias entre ambos sexos respecto al tratamiento adyuvante con radioterapia<sup>203</sup>. Debido a esta observación y a la evidencia encontrada en la literatura acerca de la influencia del sexo<sup>204,205</sup> y el PS de los pacientes<sup>205-207</sup> en la respuesta al tratamiento quimioterápico, se incluyeron estos factores como covariables en los análisis multivariantes.

La discusión de las asociaciones entre polimorfismos y efectos adversos desarrollados por los pacientes tratados con regímenes quimioterápicos basados en 5-FU, capecitabina y los esquemas FOLFOX/XELOX en adyuvancia se presenta estructurada en función de los SNPs analizados en los genes que intervienen en la cinética y dinámica de estos fármacos (*DPYD*, *TYMS*, *MTHFR*, *CDA* y proteínas transportadoras de la familia ABC) con el objeto de tener una visión global para cada SNP estudiado y los distintos tratamientos.

#### 5.1.1.-*Dihidropirimidina deshidrogenasa*

La DPYD tiene un papel muy importante en el catabolismo de fluoropirimidinas y se ha observado que su actividad varía mucho entre individuos, con diferencias de hasta veinte veces en la actividad enzimática<sup>208</sup>. Los pacientes con una baja actividad de la DPYD no consiguen inactivar adecuadamente el 5-FU y se forman excesivas cantidades de metabolitos activos, lo que conlleva la aparición de toxicidad, que puede incluso llegar a ser mortal<sup>209,210</sup>. Se ha comprobado que esta menor actividad se asocia a un mayor riesgo de sufrir toxicidad severa frente a dosis estándar de 5-FU<sup>211-213</sup> o capecitabina<sup>214</sup>. Ciccolini y cols. estimaron que un 60-70% de la toxicidad severa inducida por 5-FU o capecitabina puede ser atribuida a alteraciones en la actividad de la DPYD<sup>215</sup>.



La variación más común y estudiada en el gen *DPYD* es la IVS14+1, que da lugar al alelo \*2A (rs3918290). Deenen y cols. encontraron que el 100% de los pacientes portadores del polimorfismo IVS14+1 desarrollaron toxicidad severa<sup>216</sup>. Si bien esta mutación parece ser la más frecuentemente asociada a toxicidad, hasta ahora se han descrito más de quince variaciones, algunas de las cuales se asocian con una actividad reducida de la *DPYD*<sup>35</sup>.

En el presente estudio se analizaron dos polimorfismos en el gen *DPYD*: *DPYD*\*2A y A496G (rs2297595). Con respecto al primero de ellos, no se observó ningún paciente portador del alelo \*2A, debido a la baja frecuencia de este SNP en población caucásica<sup>93</sup>, por lo que se decidió excluir de los análisis. En cuanto a *DPYD* A496G, se encontraron asociaciones entre la presencia del alelo mutado y neutropenia, leucopenia, y náuseas y vómitos en la población de pacientes tratada con regímenes basados en capecitabina, y con náuseas y vómitos severos en el grupo de pacientes que recibieron fluoropirimidinas y oxaliplatino en adyuvancia. Hay que destacar que este SNP fue el único que se mantuvo estadísticamente significativo, tanto en el análisis de toxicidad moderada-severa como severa, en pacientes tratados con capecitabina. En consonancia con estos resultados, en el trabajo de Gross y cols., el alelo G de *DPYD* A496G se asoció a una mayor toxicidad en pacientes con cáncer gastroesofágico y cáncer de mama tratados con fluoropirimidinas que el alelo A<sup>116</sup>. Esta asociación no resultó estadísticamente significativa en pacientes con CCR, pero, tal y como indicaron los autores del trabajo, el número de portadores del alelo G en el grupo control podría haber sido sobreestimado, creando la necesidad de una evaluación futura con un mayor tamaño muestral.

Los resultados obtenidos en pacientes de CCR tratados con fluoropirimidinas concuerdan con los hallazgos previos en pacientes con cáncer gastroesofágico y de mama, y confirman la identificación del polimorfismo *DPYD* A496G como un biomarcador interesante que podría predecir toxicidad frente a fluoropirimidinas en una variedad de cánceres.

Se ha sugerido que la medición de la actividad de la *DPYD* podría ser un biomarcador de toxicidad inducida por fluoropirimidinas mejor que el genotipado, aunque recientemente se ha confirmado que el genotipado y haplotipado de *DPYD* son opciones aceptables para estratificar a los pacientes en función del riesgo de toxicidad<sup>216,217</sup> o para establecer recomendaciones de dosis para 5-FU, capecitabina y tegafur<sup>218</sup>.

### 5.1.2.- *Timidilato sintasa*

Esta enzima es la principal diana del 5-FU (Figura 6) y se han descrito polimorfismos en el gen que codifica para la TYMS que influyen en la respuesta a fluoropirimidinas. Los dos principales polimorfismos en el gen *TYMS* son una delección de 6 pb en la región 3'-UTR (rs34489327) y una repetición de 28 pb en la región promotora del gen (rs34743033); existe además un SNP G>C dentro de esta repetición que elimina una secuencia E-box del USF-1 (CACTTG>CACTTC). Este segundo polimorfismo ha sido estudiado en la literatura de dos maneras: según el número de repeticiones (2R/2R, 2R/3R y 3R/3R), o según el número de sitios E-box (2, 3 y 4). En este trabajo se ha seleccionado la segunda opción, dado que estas secuencias E-box condicionan el grado de expresión del gen de manera más fidedigna que el número de repeticiones<sup>219,220</sup>. Estos polimorfismos han sido relacionados con la expresión de *TYMS*<sup>121-123,127</sup> y, a su vez, una traducción aumentada de la enzima se ha relacionado con una mayor resistencia al fármaco y una menor supervivencia en pacientes con CCR metastásico<sup>221</sup>. En concordancia, también se han relacionado unos bajos niveles de la enzima o de ARNm en tejidos tumorales de pacientes de CCR con una mejor respuesta a la quimioterapia basada en 5-FU, pero también a un mayor riesgo de toxicidad<sup>220,222</sup>.

Se encontraron asociaciones entre los dos polimorfismos estudiados en *TYMS* en la población de estudio (*TYMS* 6del y el número de secuencias E-box USF) y efectos adversos al tratamiento con fluoropirimidinas. Concretamente, el genotipo con la delección de 6 pb en la región 3'-UTR del gen *TYMS* en homocigosis se asoció a un mayor riesgo de padecer náuseas y vómitos severos frente a esquemas basados en capecitabina y a los regímenes FOLFOX o XELOX en adyuvancia, pero también se asoció a un menor riesgo de sufrir neuropatía severa frente a esquemas basados en 5-FU. Estos resultados sugieren que los mecanismos de aparición de náuseas y vómitos y neuropatía periférica asociadas a estos fármacos son diferentes, ya que la ausencia de las 6 pb protege frente a neuropatía, pero confiere un mayor riesgo de desarrollar náuseas y vómitos a lo largo del tratamiento. Por tanto, la utilidad clínica de esta observación sería cuestionable. Cuando se analizan múltiples toxicidades, es frecuente encontrar un genotipo que protege frente a un efecto adverso, pero que confiere a su vez un mayor riesgo frente a otro<sup>137</sup>. Otra posible explicación es que el oxaliplatino asociado en muchos de los esquemas basados en 5-FU (el 77,6% eran regímenes FOLFOX) estuviera alterando la asociación obtenida. Sin embargo, la

asociación con neuropatía periférica moderada-severa se mantuvo en la regresión logística incluyendo como covariable la presencia de oxaliplatino en el régimen, no así la asociación entre este fármaco y la reacción adversa (Tabla 26).

Respecto al papel del segundo polimorfismo analizado en *TYMS*, también se obtuvieron resultados discrepantes: se observó un efecto protector de un menor número de G en la secuencia de 28 pb en la aparición de náuseas y vómitos severos frente a regímenes FOLFOX o XELOX en adyuvancia, y al mismo tiempo un factor de riesgo de desarrollo de neutropenia severa en la población que recibió 5-FU. Al igual que en el caso anterior, es posible que los mecanismos de estos dos efectos adversos por fluoropirimidinas sean diferentes. Kristensen y cols. encontraron que los pacientes homocigotos con dos repeticiones de esta secuencia de 28 pb tenían un riesgo incrementado de sufrir toxicidad severa (neutropenia, trombocitopenia, diarrea, náuseas y vómitos, neurotoxicidad, toxicidad cardíaca, alopecia y SMP) frente a regímenes basados en 5-FU<sup>223</sup>. Esta observación coincide con los resultados obtenidos en el grupo de pacientes tratados con esquemas basados en 5-FU, lo que sugiere que, al haber un menor número de puntos de unión al factor de transcripción del gen *TYMS*, los niveles de *TYMS* serían inferiores a los valores normales. Al ser esta enzima la diana del 5-FU, un déficit de *TYMS* se asociaría a una mayor cantidad de 5-FU y de sus metabolitos a nivel intracelular, lo que provocaría una mayor toxicidad al fármaco.

Los datos de la Tabla 15 reflejan que ambos polimorfismos están en LD, de tal manera que se encuentran ligados el menor número de repeticiones en tándem VNTR con la no delección de 6 pb en la región 3'-UTR ( $D' = 0,65$ ); esta relación se ha observado también en otros trabajos<sup>137,198</sup>. El efecto resultante a nivel funcional sería la combinación de la disminución de expresión de *TYMS* por los dos sitios E-box y la mayor estabilidad del ARNm de *TYMS* por la ausencia de la delección en 3'-UTR. En el caso de los pacientes tratados con 5-FU se observan mayores toxicidades (lo que en principio se asociaría a una baja expresión de *TYMS*) en los pacientes WT/WT para la delección de 6 pb, a pesar de que estos pacientes expresan más *TYMS*; sin embargo, tienen un menor número de secuencias E-box en la región promotora del gen, por lo que expresarían menos *TYMS*. Estos datos apoyarían la hipótesis de que, respecto a toxicidad, el bajo nivel de expresión a causa del menor número de sitios de unión a USF-1 prevalece sobre el aumento de la estabilidad del

ARNm por la secuencia salvaje en la región 3'-UTR. Este mismo efecto ha sido observado por otros autores, de modo que el haplotipo 2R/WT 6 pb se ha relacionado con un mayor riesgo de toxicidad al 5-FU<sup>198</sup>.

Recientemente se ha sugerido que podría ser necesario un enfoque multigénico en la aplicación de biomarcadores para predecir toxicidad. Así, Afzal y cols. obtuvieron resultados que indicaban que una combinación específica de los polimorfismos *TYMS* 6del y *MTHFR* A1298C con la actividad de MTHFR podría ser un posible marcador de predicción de toxicidad relacionada con 5-FU<sup>199</sup>.

Ya se ha llevado a cabo un ensayo clínico con terapia dirigida en función del genotipo de *TYMS* (repetición de 28 pb) en pacientes con cáncer de recto, a los que se dividía en un grupo de buen pronóstico y otro de mal pronóstico en función de la respuesta a 5-FU. Los resultados de este trabajo son prometedores en eficacia del tratamiento, aunque no en toxicidad<sup>182</sup>.

En definitiva, estos marcadores están lejos de aplicarse en la clínica, al menos en lo que a toxicidad se refiere, por su ligamiento y por sus efectos contrapuestos, y probablemente la controversia en cuanto a los resultados que existe en la literatura se deba a este hecho.

#### 5.1.3.- *Metilentetrahidrofolato reductasa*

La MTHFR interviene en el ciclo del folato catalizando la reducción del 5,10-metilentetrahidrofolato, compuesto imprescindible para la síntesis de ácidos nucleicos (Figura 6). En este trabajo se analizaron los dos polimorfismos más estudiados en el gen *MTHFR*, que conllevan una disminución de la actividad de la enzima: A1298C (rs1801131) y C677T (rs1801133)<sup>128,129</sup>.

En la población tratada con regímenes basados en capecitabina, el polimorfismo A1298C se asoció con mucositis, pero no se obtuvo ninguna asociación entre C677T y reacciones adversas a ninguna de las fluoropirimidinas estudiadas. Los pacientes homocigotos AA para la posición 1298 del gen *MTHFR* tratados con un régimen basado en capecitabina tuvieron un menor riesgo de sufrir mucositis moderada-severa que los pacientes con el

genotipo CA o CC (OR: 0,234, 95% IC: 0,068-0,803;  $p = 0,021$ ). En este sentido, Sharma y cols. encontraron que los pacientes homocigotos AA para este mismo polimorfismo tratados con capecitabina experimentaron menor toxicidad grado 2 o mayor<sup>224</sup>. También se ha visto recientemente que pacientes homocigotos CC para este polimorfismo y tratados con capecitabina en monoterapia desarrollaban mayor diarrea grado 3/4 en comparación con el resto de genotipos<sup>225</sup>. Otros autores han hallado lo mismo, pero en pacientes tratados con 5-FU o tegafur. Así, Captain y cols. observaron que el polimorfismo A1298C (concretamente el genotipo homocigoto CC), y no el C677T, estaba asociado a una mayor toxicidad en pacientes de CCR metastásico tratados con 5-FU/LV<sup>207</sup>; por su parte, Tsunoda y cols. encontraron que los portadores del genotipo AA sufrieron menos fatiga durante el tratamiento con tegafur que los heterocigotos AC, pero tampoco hallaron ninguna asociación con el polimorfismo C677T<sup>187</sup>. Otro autores, por el contrario, han encontrado que C677T (pero no A1298C) estaba asociado a toxicidad grado 3/4 y diarrea<sup>152,200,226-228</sup>. Sin embargo, estos datos son bastante cuestionables ya que, mientras que en el estudio de Glimelius y cols. fue el genotipo CC para C677T el que se asoció a unas mayores tasas de toxicidad<sup>152</sup>, otros autores obtuvieron que este mismo genotipo estaba relacionado con menor toxicidad<sup>226,228</sup>. Otros muchos trabajos no han sido capaces de encontrar ninguna asociación entre estos polimorfismos en el gen *MTHFR* y toxicidad<sup>135-137,151,181</sup>.

Tal y como se ha indicado en el apartado anterior sobre *TYMS*, la combinación de los polimorfismos *TYMS* 6del y *MTHFR* A1298C podría ser un factor de predicción de toxicidad frente a 5-FU<sup>199</sup>.

En resumen, en el estudio que se presenta en esta memoria se obtuvo una clara asociación entre el polimorfismo *MTHFR* A1298C y mucositis moderada-severa en pacientes de CCR tratados con quimioterapia basada en capecitabina, que apoya los resultados obtenidos por otros autores. Sería conveniente que este polimorfismo se estudiara en una población mayor para confirmar su posible poder de predicción de toxicidad. Además, al no haber obtenido significación estadística en pacientes que desarrollaron mucositis severa, su utilidad clínica está por demostrar.

#### 5.1.4.- *Citidina deaminasa*

La enzima CDA, también conocida como CDD, participa en la última de las tres reacciones de conversión de la capecitabina a 5-FU (Figura 5). Al analizar el polimorfismo Lys27Gln (rs2072671) en la población de pacientes tratados con fluoropirimidinas, aquellos pacientes portadores del genotipo AA tuvieron mayor riesgo de padecer neutropenia severa durante el tratamiento con regímenes quimioterápicos basados en 5-FU; y tuvieron además mayor riesgo de sufrir retrasos o reducciones de dosis durante el tratamiento con FOLFOX o XELOX en adyuvancia. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para este mismo SNP en pacientes con cáncer de páncreas tratados con gemcitabina, en quienes se ha visto que los portadores del genotipo AA estaban expuestos a un mayor riesgo de toxicidad hematológica grado 3/4 en comparación con aquellos pacientes homocigotos CC<sup>229</sup>. Sin embargo, no se ha observado que este SNP afecte al nivel de expresión de *CDA*, a diferencia de otros como el rs3215400 o el rs532545, que han sido además relacionados con SMP en pacientes tratados con capecitabina<sup>130,230</sup>.

Llama la atención que este polimorfismo en *CDA* se asociara de una forma estadísticamente significativa con la presencia de retrasos o reducciones de dosis por toxicidad a lo largo de los tratamientos FOLFOX o XELOX en adyuvancia, pero no se obtuviera ninguna asociación con ninguna de las reacciones adversas estudiadas. Quizás esto sea debido a que las toxicidades causantes de estos retrasos o reducciones de dosis en esta muestra de pacientes fueran de grado 1 ó 2, pero no alcanzaran el grado 3, a partir del cual la toxicidad se consideró severa en este análisis. El hecho de que *CDA* Lys27Gln se asociara a toxicidad frente a esquemas basados en 5-FU podría ser consecuencia de una posible participación, desconocida en la actualidad, de CDA en la ruta metabólica de este fármaco, o a la presencia de LD entre este SNP y otro realmente responsable de la asociación hallada.

En conclusión, y tal como mencionan Ciccolini y cols., el genotipado de polimorfismos en el gen *CDA*, así como en el *DPYD*, podría ser de interés en la identificación de pacientes con riesgo de sufrir SMP frente a tratamientos basados en capecitabina; aunque la falta de evidencia suficiente hace que otras aproximaciones más funcionales, como por ejemplo, establecer el fenotipo de los pacientes, puedan ser más efectivas<sup>231</sup>.

### 5.1.5.- *ATP-binding cassette B1*

Dado que en este estudio se han encontrado asociaciones entre variaciones genéticas en *ABCB1* y toxicidad tanto al 5-FU y a la capecitabina, como al irinotecan, este gen va a ser discutido en este apartado desde un punto de vista general, integrando los tres fármacos.

El gen *ABCB1*, también conocido como *MDR1* o *multidrug-resistance 1*, es miembro de la superfamilia de transportadores ABC y codifica para la glicoproteína P, que es el transportador más estudiado relacionado con el irinotecan<sup>232</sup>. La sobreexpresión de *ABCB1* en tumores se ha relacionado con resistencia a diferentes agentes quimioterápicos<sup>233</sup>, ya que se trata de un transportador que expulsa fármacos del interior al exterior celular. *ABCB1* es un gen altamente polimórfico con una importante variabilidad entre diferentes grupos étnicos<sup>176,234</sup>. Las tres variantes más estudiadas son C1236T (rs1128503), G2677T/A (rs2032582) y C3435T (rs1045642). Dichas variantes se encuentran en LD, como se evidencia en la población de estudio (Tabla 15) y como ha sido mostrado en otros trabajos<sup>174</sup>. El haplotipo que incluye estos tres polimorfismos en el gen *ABCB1* ha sido analizado (*ABCB1*\*1 para el genotipo salvaje CGC y *ABCB1*\*2 para el mutado TTT)<sup>234</sup>. Los individuos con el haplotipo \*2 expresan menos glicoproteína P, lo que resulta en una reducción en el aclaramiento de sustratos por esta bomba, como por ejemplo irinotecan<sup>176</sup>. Así, estas variantes genéticas en *ABCB1* han sido relacionadas con la farmacocinética del irinotecan y sus metabolitos, y con su resultante toxicidad y respuesta tumoral<sup>235</sup>.

En el presente trabajo, las tres variantes en *ABCB1* fueron asociadas en la población de pacientes tratada con irinotecan con un menor riesgo de reacciones adversas severas, fundamentalmente astenia y diarrea (SMP también fue estadísticamente significativo, pero debido al tratamiento de irinotecan combinado con capecitabina). A pesar de que sólo alguno de los SNPs estudiados y alguno de los efectos adversos estén estadísticamente relacionados, se va a generalizar ya que, aunque alguna asociación no sea estadísticamente significativa para los tres SNPs, sí se observa que los porcentajes de pacientes que desarrollan toxicidad son siempre similares para un efecto adverso dado, lo cual es lógico, puesto que están en LD. En consonancia con los resultados obtenidos en este estudio, el SNP *ABCB1* C1236T ha sido asociado a toxicidad grado 3/4 en pacientes de CCR metastásico que recibían esquemas FOLFIRI, de manera que los individuos portadores del

alelo C desarrollaron mayor toxicidad (diarrea, náuseas y vómitos, neutropenia, sepsis neutropénica, disnea, trombosis venosa profunda y fatiga)<sup>236</sup>. Se ha visto que el genotipo CC para el polimorfismo *ABCB1* C3435T se asocia a una expresión proteica de *ABCB1* dos veces superior a la expresión que presentan individuos con el genotipo TT<sup>237,238</sup>. La asociación entre el mayor riesgo de diarrea por irinotecan y el genotipo CC para *ABCB1* C3435T concuerda, ya que estos pacientes presentarían una mayor expulsión del metabolito SN-38 desde el hígado a las células intestinales y esta mayor concentración de SN-38 en el intestino induciría la aparición de diarrea.

Este efecto protector del haplotipo TTT en el gen *ABCB1* también es aplicable a otros efectos adversos no gastrointestinales, como el SMP y la astenia. El estudio de asociaciones genéticas con el SMP merece una mención especial, ya que se trata de un efecto adverso asociado a la capecitabina y no al irinotecan. En el análisis llevado a cabo sobre polimorfismos en *ABCB1* asociados a toxicidad frente a fluoropirimidinas, también se encontró que los pacientes portadores del alelo C para ambos polimorfismos *ABCB1* C1236T y C3435T que recibían tratamiento con capecitabina desarrollaron mayor SMP que los pacientes homocigotos TT<sup>188</sup>. Por esta razón se decidió llevar a cabo otro análisis excluyendo los pacientes que estaban siendo tratados con capecitabina en combinación con irinotecan; no hubo ningún paciente en esta muestra resultante que desarrollara SMP severo a lo largo del tratamiento, con lo que se confirmó el efecto de la capecitabina en las asociaciones obtenidas entre *ABCB1* C1236T y C3435T con SMP.

Mucho menos claro es el papel que juega *ABCB1* en la toxicidad de las fluoropirimidinas en comparación con el irinotecan, ya que no existe en la literatura ninguna asociación entre el metabolismo del 5-FU o la capecitabina y el gen *ABCB1*. No obstante, otros miembros de la misma familia que *ABCB1* (*ABCC3*, *ABCC4*, *ABCC5* y *ABCG2*) han sido asociados con el transporte del 5-FU a través de la membrana<sup>239,240</sup>. Estos polimorfismos en *ABCB1* han sido estudiados, aunque con resultados contradictorios, como posibles factores predictores de respuesta al 5-FU en pacientes de CCR<sup>174,241,242</sup> y, en menor medida, como predictores de toxicidad. Variaciones genéticas en *ABCB1* han sido relacionadas con toxicidad temprana y menor respuesta a tratamientos basados en 5-FU e irinotecan, pero basándose en la relación conocida del gen *ABCB1* con el irinotecan<sup>152</sup>. Una posible explicación a la asociación entre los polimorfismos en *ABCB1* y el tratamiento con fluoropirimidinas es una



participación desconocida hasta la fecha de *ABCB1* en el transporte de la capecitabina o de sus metabolitos. La implicación de otras variantes en otros genes relacionados con el metabolismo del 5-FU o la capecitabina, y en LD con los SNPs en *ABCB1*, podría ser otra posible explicación.

Otros autores han intentado obtener asociaciones entre SNPs en diez genes, incluyendo el *ABCB1*, y toxicidad en pacientes de CCR tratados con quimioterapia basada en 5-FU<sup>63</sup>. No hallaron ninguna asociación estadísticamente significativa, probablemente porque no incluyeron en el estudio pacientes tratados con capecitabina y porque utilizaron criterios de toxicidad diferentes. Por el contrario, Glimelius y cols. encontraron que los pacientes con el genotipo *ABCB1* 3435TT presentaron un mayor riesgo de desarrollar toxicidad temprana al tratamiento con 5-FU e irinotecan<sup>152</sup>.

Los resultados del trabajo que se presenta en esta memoria mostraron que las variantes T para los polimorfismos estudiados en *ABCB1* evitaban el desarrollo de SMP y neutropenia, pero aumentaban el riesgo de RCA para los pacientes tratados con un régimen que contuviera capecitabina; por el contrario, en el caso de los pacientes portadores de las variantes T que recibían regímenes basados en 5-FU, aumentaban las posibilidades de desarrollar diarrea.

El hecho de que ninguno de los pacientes tratados con regímenes basados en capecitabina con el genotipo TT para los tres polimorfismos analizados en *ABCB1* desarrollara neutropenia grado 2 o mayor es muy relevante, incluso con la limitación del bajo tamaño muestral. Este reducido tamaño de muestra, la asociación descrita previamente entre neutropenia y el genotipo de *ABCB1* en pacientes tratados con irinotecan<sup>236</sup> y la mayor proporción de pacientes que recibieron irinotecan en el grupo de tratamiento con capecitabina en comparación con el grupo que recibió 5-FU (32,4% vs. 17,9%), hacían pensar que los resultados obtenidos podrían estar afectados por el tratamiento combinado con irinotecan. Sin embargo, cuando los tratamientos con irinotecan fueron excluidos del análisis, la asociación entre el polimorfismo C1236T y neutropenia en pacientes tratados con capecitabina se mantuvo estadísticamente significativa. A pesar de que la asociación entre C3435T y diarrea en pacientes tratados con 5-FU dejó de ser estadísticamente significativa al excluir a los pacientes tratados con irinotecan, los porcentajes se

mantuvieron muy similares; esto sugiere que el bajo tamaño de la muestra resultante es la causa fundamental de la falta de significación.

De esta manera, para aquellos individuos con una o más variantes de estos SNPs, la ventaja del tratamiento con capecitabina en términos de menor riesgo de neutropenia y SMP parece clara. Por el contrario, los portadores del genotipo CC para C3435T tuvieron un menor riesgo de sufrir diarrea moderada-severa frente a esquemas con 5-FU en comparación con el genotipo heterocigoto CT u homocigoto TT. Se observaron pequeñas diferencias en los fármacos usados en combinación con 5-FU o capecitabina. Estas diferencias podrían deberse a la mayor proporción de CCRs avanzados en el brazo de 5-FU en comparación con el de capecitabina (71,6% vs. 58,1%), ya que en estos estadios más evolucionados de la enfermedad es más frecuente la combinación con otros fármacos. Sin embargo, estas diferencias no se consideraron relevantes, de manera que las asociaciones obtenidas entre reacciones adversas y los polimorfismos en *ABCB1* dan a entender una relación directa con el tratamiento con fluoropirimidinas.

Un punto aparentemente discordante es el mostrado en las Tablas 20 y 47, en las que se observa que los pacientes TT para el SNP C3435T tratados con una combinación que contenga 5-FU tienen una probabilidad del 42,9% de desarrollar diarrea moderada-severa, en comparación con pacientes con el mismo genotipo tratados con una combinación que contenga irinotecan, de los cuales ninguno desarrolló diarrea severa. Esto nos muestra dos efectos contrapuestos en pacientes con el genotipo TT, en el que el papel protector de diarrea en el tratamiento con irinotecan sería mayor que el de riesgo de diarrea en el tratamiento con 5-FU. Así, ningún paciente TT tratado bien con XELIRI, bien con FOLFIRI, sufrió diarrea severa, mientras que sí hubo casos de pacientes con este genotipo que desarrollaron diarrea severa frente a esquemas FOLFOX.

En el análisis de polimorfismos en la cohorte de pacientes tratada con fluoropirimidinas y oxaliplatino en adyuvancia no se encontró ninguna asociación entre *ABCB1* y reacciones adversas. Esto se debe probablemente a que los pacientes tratados con 5-FU y los pacientes tratados con capecitabina fueron analizados de manera conjunta, al igual que en la mayoría de estudios que existen, con lo que se pierden las diferencias encontradas al analizar ambos fármacos por separado.

Estos marcadores son probablemente los más relevantes desde el punto de vista clínico encontrados en este trabajo; su hallazgo dio lugar a un artículo original en *Pharmacogenomics*<sup>188</sup>, que se puede consultar en el Anexo 4 de esta memoria. Sin embargo, resulta imprescindible su validación en cohortes mayores antes de poder ser aplicados en la práctica clínica. De ser confirmados, los oncólogos podrían disponer de una herramienta muy útil para la distinción de un subgrupo de pacientes, los portadores del alelo T para los tres polimorfismos de *ABCB1*, cuyo riesgo de neutropenia y SMP puede llegar a ser mínimo cuando son tratados con un régimen que contenga capecitabina, aunque con el precio de un mayor riesgo de desarrollar RCA. Además, estos pacientes portadores de las variantes T tendrán un riesgo mínimo de sufrir diarrea severa frente a tratamientos que contengan irinotecan.

#### 5.1.6.- *ATP-binding cassette C4 y C5*

ABCC4 y ABCC5 son también miembros de la familia de transportadores de membrana ABC y se sabe que participan en la expulsión del 5-FU al exterior de la célula (Figura 5). No existen estudios en la literatura acerca del papel de variantes genéticas en *ABCC4* ni *ABCC5* en la farmacocinética de las fluoropirimidinas, pese a estar implicadas dichas proteínas en su ruta metabólica. Hagmann y cols. encontraron que células pancreáticas resistentes al 5-FU sobreexpresan *ABCC3*, *ABCC4* y *ABCC5*, lo que no es de extrañar si se tiene en cuenta que esta proteína constituye una bomba de eflujo que confiere resistencia a múltiples fármacos<sup>239</sup>. En el presente trabajo se analizaron los polimorfismos T38G (rs3742106) y A311G (rs4148551) en *ABCC4* y A1366C (rs3805114) en *ABCC5*.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, la presencia de las variantes *ABCC4* 38G y 311G en los pacientes tratados con esquemas basados en capecitabina podría conllevar un menor riesgo de desarrollar neuropatía periférica y neutropenia moderadas-severas. La neuropatía, no obstante, es un efecto adverso característico del oxaliplatino. Por lo tanto, la combinación de oxaliplatino en el 54% de los pacientes que recibieron capecitabina podría haber alterado la asociación entre estos polimorfismos y la aparición de neuropatía periférica durante el tratamiento. La asociación entre los polimorfismos T38G y A311G en

*ABCC4* y neuropatía periférica se confirmó en la regresión logística que incluía oxaliplatino dentro del esquema quimioterápico como covariable; pero no se confirmó en el análisis univariante que excluía aquellos pacientes que habían recibido oxaliplatino en combinación con capecitabina, aunque las tendencias se mantuvieron similares. El reducido número de pacientes de la muestra resultante (37) podría haber influido en la falta de significación estadística. Por lo tanto, no podemos confirmar que esta asociación con capecitabina no se deba a la combinación con oxaliplatino, y para aclararlo se requieren más estudios.

Por otro lado, no se obtuvo ninguna asociación entre toxicidad a fluoropirimidinas y el polimorfismo A1366C en el gen *ABCC5*, probablemente debido a que la mayor parte de los pacientes que recibieron fluoropirimidinas eran portadores del genotipo AA para este SNP (80,6% en el caso de 5-FU, 87,8% en los pacientes tratados con capecitabina y 93,6% en el grupo de pacientes tratados en adyuvancia con fluoropirimidinas y oxaliplatino); esto merma la potencia estadística del análisis teniendo en cuenta además el bajo tamaño muestral.

En definitiva, se han identificado asociaciones entre los polimorfismos analizados en el gen *ABCC4* y reacciones adversas, pero son necesarios estudios de validación en cohortes de pacientes más numerosas.

## 5.2.- Farmacogenética de reacciones adversas frente a oxaliplatino

El oxaliplatino y el irinotecan se combinan frecuentemente con el 5-FU o con la capecitabina para tratar pacientes de CCR con una eficacia muy similar. En cuanto al perfil de toxicidad, sin embargo, el irinotecan produce más náuseas y vómitos, mientras que el efecto adverso más característico del oxaliplatino es la neuropatía periférica<sup>53</sup>. En la cohorte de pacientes incluidos en este trabajo la toxicidad gastrointestinal grado 3/4 fue ligeramente más habitual en aquellos pacientes que recibieron oxaliplatino que en el grupo tratado con regímenes que contenían irinotecan, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. En consonancia con estos resultados, Moosmann y cols. ya obtuvieron previamente mayores tasas de toxicidad no hematológica severa en pacientes de CCR tratados con el esquema XELOX que en aquéllos tratados con XELIRI<sup>243</sup>. Los autores de este trabajo también observaron que la frecuencia de SMP, el efecto adverso más característico de la capecitabina, era mayor entre los pacientes tratados con XELOX que entre los que recibían XELIRI. Esto pudo deberse a la menor dosis de capecitabina utilizada en los regímenes XELIRI en comparación con los esquemas XELOX, aunque también sugiere que el irinotecan y el oxaliplatino podrían modificar el perfil de toxicidad de la capecitabina. Por esta razón se incluyeron en los análisis de oxaliplatino e irinotecan efectos adversos típicos del tratamiento con fluoropirimidinas. El hecho de que una mayor proporción de pacientes del presente estudio desarrollara RCA en los tratamientos basados en irinotecan, en comparación con los basados en oxaliplatino, pudo ser una consecuencia del mayor empleo de anticuerpos monoclonales anti-EGFR en el primero de estos grupos con respecto al segundo (25% vs. 10,4%, respectivamente).

En cuanto a la frecuencia de neuropatía periférica severa en los pacientes que recibieron quimioterapia basada en oxaliplatino (12,3%), ésta fue bastante similar a la descrita en otros trabajos con pacientes que recibían el esquema FOLFOX<sup>133,181</sup>. Las pequeñas diferencias podrían deberse a que en estos estudios se utilizó otra escala para valorar la toxicidad neurológica que tiene en cuenta también la duración de la misma, además de la intensidad<sup>244</sup> y de los diferentes fármacos combinados con oxaliplatino en la población del presente trabajo, por ejemplo capecitabina en el 37,7% de ellos. Se han descrito diferencias en la severidad de la neuropatía inducida por oxaliplatino si éste está asociado a 5-FU o a capecitabina<sup>245</sup>.

Las asociaciones entre los polimorfismos analizados en los genes que codifican enzimas metabolizadoras de oxaliplatino (*GSTP1* y *GSTT1*), genes de reparación del ADN (*ERCC1*, *ERCC2* y *XRCC1*) y en el *EGFR* se discuten a continuación.

### 5.2.1.- *Glutación S-transferasas*

Estas enzimas participan en la detoxificación de algunos fármacos mediante conjugación con glutatión. Concretamente, la *GSTP1* participa en la detoxificación del oxaliplatino y se ha relacionado con resistencia al mismo<sup>132</sup>.

En el presente trabajo no se obtuvo ninguna asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo Ile105Val (rs1695) estudiado en *GSTP1* y efectos adversos a regímenes basados en oxaliplatino. Se sabe que este polimorfismo supone una alteración de la afinidad de la enzima por el sustrato<sup>134</sup>; se ha descrito además que los portadores del alelo mutado Val en homocigosis tienen mayor riesgo de desarrollar neurotoxicidad grado 3 que los heterocigotos u homocigotos para el alelo Ile, probablemente debido a una disminución de la actividad catabólica de la enzima y, por tanto, a una disminución en la detoxificación del oxaliplatino<sup>151,181,246</sup>. McLeod y cols. obtuvieron que los pacientes homocigotos para el alelo variante fueron más propensos a discontinuar el tratamiento con FOLFOX debido al desarrollo de neurotoxicidad y que estos mismos pacientes desarrollaban más neurotoxicidad grado 3 tras regímenes IROX<sup>151</sup>. Sin embargo, otros trabajos, al igual que el presente, no encontraron ninguna asociación entre este polimorfismo y toxicidad<sup>135,136,247-249</sup>, o encontraron resultados contradictorios<sup>133,137,250</sup>. En pacientes con cáncer gastrointestinal y terapia basada en platinos, los homocigotos para el alelo *GSTP1* 105Ile tuvieron mayor riesgo de desarrollar neutropenia grado 3/4 y neurotoxicidad grado 3 que los homocigotos o heterocigotos para el alelo *GSTP1* 105Val<sup>133,137</sup>. En el trabajo de Inada y cols., los autores observaron que pacientes de CCR con el genotipo salvaje tenían mayor probabilidad de sufrir neuropatía periférica temprana grado 1 que los portadores del alelo variante, aunque no se estableció ninguna asociación con neurotoxicidad grado 2 o superior<sup>250</sup>. Por su parte, Di Francia y cols. proponen un panel de siete polimorfismos, incluido *GSTP1* Ile105Val, para evaluar perfiles de buenos y malos respondedores a regímenes basados en fluoropirimidinas y oxaliplatino; mediante este panel, los pacientes

homocigotos para el alelo Val se incluyen en el grupo de buenos respondedores y de menor toxicidad neurológica<sup>69</sup>.

Según los conocimientos disponibles en la actualidad, la *GSTP1* no tiene ningún papel en el metabolismo del 5-FU ni del irinotecan. Pese a ello, Braun y cols. hallaron una asociación entre el alelo variante 105Val y toxicidad grado 3 o mayor en 270 pacientes de CCR tratados con FOLFIRI en primera o segunda línea de tratamiento<sup>63</sup>. Además, pacientes con cáncer de recto tratados con quimioterapia neoadyuvante basada en 5-FU y portadores del genotipo Val/Val tuvieron menor riesgo de desarrollar toxicidad hematológica a lo largo del tratamiento que los portadores del genotipo Ile/Ile<sup>251</sup>.

Al igual que en el caso de Ile105Val en el gen *GSTP1*, tampoco se obtuvo en este análisis de toxicidad a regímenes basados en oxaliplatino ninguna asociación entre efectos adversos y el número de copias de *GSTT1*. El bajo tamaño de la muestra, especialmente cuando el efecto adverso o el alelo analizados no eran frecuentes, fue una limitación importante de este análisis. Además, ningún estudio hasta la fecha ha logrado establecer ninguna asociación estadísticamente significativa entre el número de copias de *GSTT1* y la toxicidad al oxaliplatino<sup>135-137</sup>, aunque uno de ellos mostró una tendencia a presentar menor toxicidad hematológica en presencia del alelo nulo de este gen en pacientes con cáncer gástrico<sup>137</sup>.

Por lo tanto, a la vista de los resultados obtenidos y de la bibliografía consultada, no se puede recomendar el genotipado de la variante Ile105Val en el gen *GSTP1* ni del número de copias de *GSTT1* para identificar pacientes con alto riesgo de desarrollar toxicidades relevantes al tratamiento quimioterápico basado en oxaliplatino en CCR.

#### 5.2.2.- Sistemas de reparación de ADN por escisión de nucleótidos: *ERCC1* y *ERCC2*

Las proteínas ERCC están implicadas en los sistemas de reparación del ADN por escisión de nucleótidos (Figura 7), de manera que polimorfismos situados en los genes que codifican estas proteínas podrían contribuir a las diferencias interindividuales en la respuesta al oxaliplatino. Pese a que la gran mayoría de los estudios farmacogenéticos sobre estos genes

de reparación se centran en el análisis de eficacia, se decidió incluir en este trabajo algunas variantes genéticas tras haber encontrado en la bibliografía ciertas asociaciones significativas con mayor o menor toxicidad a los derivados del platino<sup>135,137,250</sup>.

Se obtuvo una asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo Asn118Asn (rs11615) en *ERCC1* y neutropenia severa en el grupo de pacientes tratados con esquemas que contenían oxaliplatino y también de manera específica en los pacientes que recibieron fluoropirimidinas asociadas a oxaliplatino en adyuvancia. Se observó un menor riesgo de desarrollar neutropenia en aquellos pacientes portadores de los genotipos CT y TT, en comparación con pacientes homocigotos CC. Se ha observado que este polimorfismo afecta a la traducción del ARNm de *ERCC1*<sup>139,140</sup>. Los resultados obtenidos son coherentes, ya que se espera que aquellos individuos con el genotipo CC presenten una menor actividad de *ERCC1*, y por tanto, una menor capacidad de reparación del ADN y un riesgo incrementado de desarrollar toxicidad frente al oxaliplatino. Además, estos resultados coinciden con los obtenidos por Boige y cols., quienes encontraron que los portadores del genotipo CC para Asn118Asn tenían mayores probabilidades de desarrollar toxicidad hematológica que pacientes con otros genotipos, aunque esta asociación no alcanzó significación estadística<sup>135</sup>. Sin embargo, otros estudios no han logrado encontrar asociaciones<sup>136,151,181,200,252</sup> o han encontrado resultados contradictorios<sup>228</sup>. El análisis de haplotipos en lugar de polimorfismos aislados podría ser de utilidad también en este caso. Así, Goekkurt y cols. encontraron que el haplotipo *ERCC1* 118T/8092C estaba relacionado con la aparición de neutropenia grado 3/4 en pacientes con cáncer gástrico<sup>137</sup>.

La neuropatía periférica, el efecto adverso más característico del oxaliplatino, no fue asociada al SNP *ERCC1* Asn118Asn en la cohorte de pacientes del presente trabajo, al igual que en otros estudios<sup>246,250</sup>. Sin embargo, Inada y cols. asociaron el alelo salvaje T con neuropatía temprana grado 1 en pacientes con CCR que recibían tratamiento basado en oxaliplatino, aunque no encontraron ninguna asociación con mayores grados de neuropatía<sup>250</sup>.

El gen *ERCC2*, también conocido como *XPD* o *xeroderma pigmentosum* grupo D, participa igualmente en el sistema de reparación de ADN por excisión de nucleótidos, corrigiendo el daño producido por el oxaliplatino<sup>253</sup> (Figura 7). Las frecuencias genotípicas para el



polimorfismo *ERCC2* Lys751Gln (rs13181) observadas en el conjunto de los 137 pacientes no cumplieron el equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p = 0,037$ ) (Tabla 14), por lo que los resultados han de ser interpretados con mayor cautela. No obstante, puede observarse en la misma tabla que dichas frecuencias son prácticamente iguales a las frecuencias proporcionadas por HapMap en población caucásica. La variante *ERCC2* 751Gln se ha relacionado con una alteración en la estructura secundaria del ARNm, lo que confiere menor estabilidad al ARNm y menor nivel de la proteína *ERCC2*<sup>254</sup>. En el presente trabajo se observó un mayor riesgo de presentar náuseas y vómitos severos en los pacientes que recibían esquemas basados en oxaliplatino y portadores del genotipo salvaje Lys/Lys. Sin embargo, Boige y cols. observaron una mayor toxicidad hematológica en pacientes homocigotos Gln/Gln tratados con el esquema FOLFOX, pero no encontraron ninguna asociación con toxicidad gastrointestinal<sup>135</sup>. Por otra parte, otros autores no han encontrado ninguna relación entre este polimorfismo y toxicidad al oxaliplatino en pacientes con CCR<sup>63,136,151,255</sup>

También se ha estudiado el efecto del polimorfismo Lys751Gln de *ERCC2* en el desarrollo de toxicidad en pacientes con cáncer gastrointestinal. Así, en una población de pacientes tratados con regímenes basados en oxaliplatino o cisplatino se obtuvieron asociaciones estadísticamente significativas entre el polimorfismo Lys751Gln y también el Asp312Asn (rs1799793), no incluido en este trabajo, y el desarrollo de neutropenia, leucopenia y nefrotoxicidad grados 3/4<sup>137</sup>. Así, los individuos homocigotos Lys/Lys estuvieron expuestos a una mayor toxicidad hematológica, pero fueron los homocigotos Gln/Gln los que desarrollaron una nefrotoxicidad más severa a lo largo del tratamiento. Además, en este trabajo el haplotipo que contenía ambas variantes (Lys751Gln y Asp312Asn) fue identificado como un factor de riesgo independiente de aparición de nefrotoxicidad. Ambos polimorfismos han sido relacionados con una capacidad subóptima de reparación del ADN<sup>256</sup>.

Por lo tanto, el polimorfismo Asn118Asn en el gen *ERCC1* podría estar asociado a neutropenia en pacientes tratados con oxaliplatino, mientras que el polimorfismo Lys751Gln en el *ERCC2* podría asociarse a náuseas y vómitos frente a este tratamiento. Sin embargo, el alelo variante para este último SNP, al contrario de lo obtenido por la mayoría

de los estudios, se asoció a una menor toxicidad, lo que podría deberse al no cumplimiento del equilibrio de Hardy-Weinberg de *ERCC2* Lys751Gln en la población de este estudio.

#### 5.2.3.- *Sistemas de reparación de ADN por escisión de bases: XRCC1*

Los polimorfismos Gln399Arg (rs25487) y Arg194Trp (rs1799782) en el gen *XRCC1* confieren a la enzima resultante una menor capacidad para reparar las lesiones inducidas por el oxaliplatino, de modo que el primero de ellos ha sido asociado a resistencia a oxaliplatino<sup>141</sup>.

En el presente trabajo se analizó el SNP Gln399Arg y se estudió su posible asociación con toxicidad en la cohorte de pacientes que recibieron esquemas quimioterápicos basados en oxaliplatino, con resultado negativo. Estos datos coinciden con los obtenidos en otros estudios que incluían pacientes con CCR<sup>63,136,151,181,200</sup> y pacientes con cáncer gástrico<sup>137</sup>. Sin embargo, Wang y cols. concluyeron que pacientes con cáncer de pulmón portadores de al menos un alelo variante *XRCC1* 399Arg tenían un riesgo incrementado de sufrir toxicidad gastrointestinal grado 3/4 cuando eran tratados en primera línea con quimioterapia basada en cisplatino<sup>257</sup>. Esta diferencia en los resultados entre el estudio de Wang y cols. y el presente podría deberse, tanto al fármaco administrado (cisplatino vs. oxaliplatino), como al tipo de cáncer que padecían los pacientes (cáncer de pulmón vs. CCR).

En cualquier caso, los resultados obtenidos no conducen a pensar en este polimorfismo como un posible biomarcador de toxicidad al oxaliplatino en futuros estudios farmacogenéticos de toxicidad a la quimioterapia en CCR.

#### 5.2.4.- *Receptor del factor de crecimiento epidérmico*

El factor de crecimiento epidérmico se une a su receptor, lo que activa una cascada de señales intracelulares que induce finalmente la división celular e inhibe la apoptosis. Se ha comprobado que, si los niveles de ARNm de EGFR están aumentados, la probabilidad de desarrollar metástasis y tumores más agresivos también aumenta<sup>142</sup>. El polimorfismo

rs45559542 en el gen *EGFR* consiste en un número variable de repeticiones del dinucleótido CA en el intrón 1 del gen y se ha visto que afecta a los niveles de ARNm y de proteína, de tal manera que estos niveles están inversamente relacionados con el número de repeticiones CA<sup>143</sup>. Así, los pacientes con dos alelos que portan 16 repeticiones, tienen peor respuesta a oxaliplatino combinado con 5-FU que aquéllos que tienen un alelo con 16 repeticiones y el otro con 18 ó 20<sup>144</sup>. No existe ningún consenso acerca de cómo agrupar los individuos en función del número de repeticiones CA, por lo que en este trabajo se decidieron agrupar en aquellos portadores de al menos un alelo con 20 o más repeticiones por una parte y el resto por otra, tal y como han hecho otros autores<sup>258</sup>.

No se obtuvo ninguna asociación estadísticamente significativa con ninguno de los efectos adversos analizados en el estudio y no existe en la literatura ningún estudio que relacione este polimorfismo con toxicidad al oxaliplatino, por lo que su estudio debería abandonarse en posteriores trabajos de validación.

### 5.3.- Farmacogenética de reacciones adversas frente a irinotecan

En el grupo de pacientes que recibieron regímenes quimioterápicos basados en irinotecan las reacciones adversas más comunes fueron neutropenia y diarrea (16,1% en ambos casos), lo que coincide con los efectos adversos más frecuentemente asociados a este fármaco, además de náuseas y vómitos (Tabla 2). Estas observaciones son bastante similares a los resultados obtenidos por Rougier y cols. en una muestra de 133 pacientes de CCR metastásico que recibían irinotecan a dosis de 300-350 mg/m<sup>2</sup> (22% diarrea y 14% neutropenia)<sup>259</sup>. Es posible que la diferencia en la frecuencia de aparición de diarrea entre estos dos trabajos se deba fundamentalmente a la menor dosis de irinotecan que se administró a los pacientes del presente estudio (180 mg/m<sup>2</sup>), la mayoría de ellos también en un estadio avanzado de la enfermedad (96,4%). Otra explicación que podría justificar esta discrepancia es la variación en el tamaño muestral de ambos trabajos.

Los polimorfismos que se incluyeron en este análisis se localizan en genes que codifican para la principal enzima metabolizadora de SN-38, *UGT1A1*, y en *ABCB1*, que codifica para la glicoproteína P, el transportador de membrana más estudiado en cuanto a su relación con el irinotecan; este último gen y su relación con la toxicidad al irinotecan ya ha sido discutido en el apartado anterior. Además, se analizaron asociaciones con variaciones en los genes que se han discutido anteriormente relacionados con la respuesta al oxaliplatino (*GSTP1*, *GSTT1*, *ERCC1*, *ERCC2*, *XRCC1* y *EGFR*), ya que existen estudios que han encontrado asociaciones entre polimorfismos en estos genes y respuesta al tratamiento con irinotecan<sup>63,178-181</sup>.

#### 5.3.1.- Uridil glucuronosil transferasa 1A1

La *UGT1A1* es la principal enzima que participa en el metabolismo del SN-38, el metabolito activo del irinotecan (Figura 8). La relación del polimorfismo *UGT1A1*\*28 (rs8175347) con la farmacocinética del fármaco y del SN-38 está bien establecida: pacientes con el genotipo 7/7, es decir, portadores de dos alelos con 7 repeticiones del dinucleótido TA en el promotor del gen, presentan mayor área bajo la curva tiempo-concentración plasmática de SN-38 y menores ratios de SN-38 glucuronizado/SN-38. Esto se ha comprobado, con

distintas dosis, en pacientes adultos y pediátricos, en distintos tumores, y en pacientes de origen asiático o europeo<sup>153,260-263</sup>. La asociación de este polimorfismo con toxicidad en pacientes tratados con irinotecan se ha demostrado en varios trabajos (revisado en<sup>173</sup>).

A pesar del alto nivel de evidencia que existe en la literatura acerca de este SNP y de que es uno de los dos biomarcadores recomendados por las agencias reguladoras FDA y EMA, no se encontró en el presente trabajo ninguna asociación estadísticamente significativa con ninguno de los efectos adversos desarrollados por el grupo de pacientes que recibieron irinotecan a dosis de 180 mg/m<sup>2</sup>.

El primer estudio que marcó el inicio de la llamada “irinogenomics”, firmado por Innocenti en el 2004, estableció una fuerte asociación entre el desarrollo de neutropenia grado 4 y el genotipo 7/7<sup>158</sup>. Sin embargo, la validez externa de este estudio resulta controvertida, fundamentalmente porque se administró una dosis de 350 mg/m<sup>2</sup> de irinotecan en comparación con los 180 mg/m<sup>2</sup> que normalmente se utilizan en los regímenes FOLFIRI. Esta limitación fue resuelta dos años más tarde por Toffoli y cols., quienes demostraron que el alelo \*28 se relacionaba con una mayor toxicidad hematológica grado 3/4 al primer ciclo del esquema FOLFIRI, utilizando dosis de irinotecan de 180 mg/m<sup>2</sup> <sup>264</sup>. En el metaanálisis llevado a cabo por Hoskins y cols., los autores concluyen que el riesgo de toxicidad hematológica para los pacientes con el genotipo 7/7 es dosis-dependiente cuando se administra irinotecan a dosis altas (> 250 mg/m<sup>2</sup>) y medias (150-250 mg/m<sup>2</sup>), pero no cuando se hace a dosis bajas (< 150 mg/m<sup>2</sup>)<sup>265</sup>. Con posterioridad a este metaanálisis se han publicado trabajos cuyos resultados coinciden con esta observación, de modo que se han encontrado asociaciones con toxicidad utilizando dosis de 200 mg/m<sup>2</sup> <sup>151</sup>, pero no con dosis de 80 mg/m<sup>2</sup> <sup>266</sup>. Por el contrario, otros trabajos, además del presente, no han demostrado que exista una asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo *UGT1A1*\*28 y toxicidad frente a dosis de irinotecan de 180 mg/m<sup>2</sup> <sup>63,135</sup>. El hecho de que la asociación entre *UGT1A1*\*28 y toxicidad no alcanzara significación estadística en el presente trabajo podría deberse a la menor dosis de irinotecan administrada en los pacientes incluidos, ya que no se administra en monoterapia, sino combinado con otros fármacos, así como al bajo tamaño muestral.

A la vista de estos resultados, podría sugerirse no realizar el genotipado de *UGT1A1*\*28 para pacientes que van a iniciar terapia con irinotecan asociado a otro fármaco. Sin embargo, el bajo coste de estas pruebas y la evidencia acumulada por la comunidad científica recomiendan el genotipado de este polimorfismo a todo paciente que vaya a iniciar cualquier terapia que contenga irinotecan y a llevar un seguimiento más estricto de los portadores del genotipo \*28/\*28. Además, el trabajo de Marcuello y cols.<sup>183</sup> abre una nueva vía a la utilización de este test, pues los autores observaron cómo la dosis de 180 mg/m<sup>2</sup> de irinotecan utilizada en el esquema FOLFIRI era considerablemente menor que la dosis máxima tolerada para los pacientes con genotipo *UGT1A1* \*1/\*1 y \*1/\*28, mientras que para los \*28/\*28 era un 30% superior a la dosis máxima tolerada.

*UGT1A1*\*93 (rs10929302) es una variante común localizada en la región reguladora PBREM (del inglés, *phenobarbital response enhancer module*), situada aguas arriba del gen *UGT1A1*. Las frecuencias genotípicas para este polimorfismo observadas en el conjunto de pacientes incluidos en este trabajo, al igual que en el caso de *ERCC2* Lys751Gln, tampoco cumplieron el equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p = 0,026$ ), pero fueron muy parecidas a las frecuencias halladas en HapMap para población caucásica (Tabla 14). Se ha observado que la predicción del desarrollo de neutropenia severa frente a irinotecan de esta variante puede ser comparable a la de *UGT1A1*\*28<sup>158</sup> o incluso mejor<sup>161,166</sup>. Sin embargo, otros estudios, incluido el presentado en esta memoria, no han encontrado asociaciones estadísticamente significativas entre este polimorfismo y el desarrollo de toxicidad severa<sup>135,151</sup>.

Existen evidencias de la importancia de analizar el *locus UGT1A* completo, en lugar de un polimorfismo único. Así, Cecchin y cols. analizaron *UGT1A1*\*28, *UGT1A1*\*60, *UGT1A1*\*93, *UGT1A7*\*3 y *UGT1A9*\*22 en 250 pacientes con CCR<sup>160</sup>. Dos de ellos, *UGT1A1*\*93 y *UGT1A1*\*60 aparecieron con frecuencia en LD con *UGT1A1*\*28 en población blanca, lo que coincide con los datos presentados en la Tabla 15, en la que se observa que *UGT1A1*\*93 y *UGT1A1*\*28 están en alto LD ( $D' = 0,98$ ). La dosis de irinotecan utilizada en el trabajo de Cecchin y cols. fue 180 mg/m<sup>2</sup> bisemanal conjuntamente con 5-FU. Se buscó la correlación con la toxicidad tras el primer ciclo y también con la más grave a lo largo del tratamiento. Uno de los haplotipos encontrados, que incluía todos los alelos anteriores excepto *UGT1A9*\*22, se correlacionó con toxicidad hematológica severa. Esta puede ser una forma

de mejorar el poder predictivo de las pruebas farmacogenéticas orientadas a disminuir la aparición de efectos adversos severos al tratamiento.

### 5.3.2.- *Otros genes: GSTT1, ERCC1 y ERCC2*

En el análisis multivariante de la muestra de pacientes tratados con esquemas que contenían irinotecan se encontró una menor probabilidad de padecer astenia severa en los pacientes portadores de dos copias del gen *GSTT1* que en los portadores de una o ninguna copia (OR: 0,074, 95% IC: 0,009-0,617;  $p = 0,016$ ). La *GSTT1*, como se ha visto anteriormente, es miembro de la familia de las GSTs y se sabe que participa en la detoxificación del oxaliplatino (Figura 7). Se ha observado que la delección de este gen predice toxicidad asociada a regímenes FOLFIRI en pacientes de CCR metastásico<sup>180</sup>. Los autores del estudio obtuvieron una asociación entre la ausencia de copias del gen y el desarrollo de toxicidad gastrointestinal grado 3 ( $p = 0,053$ ). Esta ausencia de *GSTT1* también podría implicar una mayor toxicidad frente a la quimioterapia administrada en pacientes con leucemia mieloide aguda<sup>267,268</sup> y en pacientes con cáncer de pulmón<sup>269</sup>. Como sugieren estos resultados, la *GSTT1* podría participar en el metabolismo de otros fármacos además del oxaliplatino.

El polimorfismo *ERCC1* Asn118Asn se relacionó con mucositis severa en pacientes que recibieron esquemas basados en irinotecan. La mucositis es un efecto adverso frecuente en tratamientos que contienen fluoropirimidinas (Tabla 2); el hecho de que el 91,1% de los pacientes que recibían tratamientos basados en irinotecan estuvieran recibiendo además 5-FU o capecitabina podría hacer pensar que la combinación con fluoropirimidinas estuviera afectando a la asociación encontrada. Sin embargo, estos datos coinciden con los del estudio *GERCOR*, en el que los autores obtuvieron mayores frecuencias de mucositis severa en pacientes de CCR tratados con FOLFIRI que en aquéllos que recibían el esquema FOLFOX, lo que apuntaría a un efecto aditivo del 5-FU y el irinotecan en cuanto a la aparición de mucositis<sup>53</sup>. A nivel molecular, se ha visto que *ERCC1* también participa en el sistema de reparación del daño en el ADN inducido por la TOP1 en células de mamíferos<sup>270</sup>. Dada la actividad del irinotecan frente a la TOP1, *ERCC1* podría tener un papel en el

desarrollo de toxicidad inducida por irinotecan, aunque de momento el mecanismo resulta desconocido.

Al contrario que *ERCC1*, no se ha descrito hasta la fecha la participación de *ERCC2* en la reparación del daño en el ADN causado por la TOP1. Sin embargo, se han estudiado polimorfismos en este gen en cuanto a su relación con la respuesta y toxicidad a tratamientos basados en irinotecan y, por tanto, no se puede descartar una posible asociación<sup>63,178,179,181</sup>. La relación de *ERCC2* Lys751Gln con diarrea severa, obtenida en el análisis univariante en pacientes tratados con quimioterapia basada en irinotecan, es coherente con esta hipótesis. En el análisis que incluía individuos tratados con regímenes que contenían oxaliplatino, el genotipo Lys/Lys para este polimorfismo se asoció a una mayor probabilidad de desarrollar náuseas y vómitos severos, mientras que con pacientes que recibían irinotecan fue el alelo 751Gln el asociado a un mayor riesgo de sufrir reacciones adversas (diarrea severa) a lo largo del tratamiento. El gen *ERCC2* podría ser, por tanto, un biomarcador que ayudara a elegir un tratamiento u otro (oxaliplatino o irinotecan) en función del genotipo de cada paciente para el polimorfismo Lys751Gln y su predisposición a presentar toxicidad severa. De esta manera, si un paciente es portador del alelo *ERCC2* 751Gln sería conveniente que recibiera oxaliplatino, pero si tiene el genotipo Lys/Lys debería ser tratado con irinotecan y así minimizar la aparición de toxicidad severa.

Los datos discutidos en esta memoria sobre farmacogenética de la toxicidad a tratamientos basados en oxaliplatino o irinotecan han sido aceptados recientemente para su publicación en la revista *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* (Anexo 5).





El trabajo que se presenta en esta memoria pretende ser un primer análisis de asociación entre polimorfismos genéticos y reacciones adversas al tratamiento quimioterápico en CCR, que permita seleccionar aquéllos que merezca la pena evaluar en una población mayor de pacientes y descartar el resto. En él se han identificado variantes genéticas asociadas de manera estadísticamente significativa a efectos adversos frente a los fármacos más frecuentemente utilizados en la quimioterapia del CCR. Sin embargo, este trabajo tiene algunas limitaciones importantes como son el bajo tamaño muestral (especialmente en la cohorte de pacientes que recibió esquemas basados en irinotecan), el posible efecto de otros fármacos asociados a los regímenes en el perfil de toxicidad y la heterogeneidad de la población en cuanto a la no distinción de tratamientos en adyuvancia o en enfermedad metastásica en la mayor parte de los análisis llevados a cabo. Estos posibles biomarcadores encontrados necesitan validarse en una muestra más amplia de pacientes y podrían ser de gran utilidad si se confirmaran. Resultaría un beneficio múltiple: el oncólogo tendría una herramienta útil a la hora de seleccionar de una manera objetiva el tratamiento menos tóxico; la calidad de vida del paciente mejoraría sin disminuir la efectividad del tratamiento; finalmente, el Sistema de Salud optimizaría los recursos disponibles y reduciría los costes asociados a los efectos adversos graves.

El 5-FU y su profármaco capecitabina han demostrado tener un perfil de eficacia similar; sin embargo, al analizar el perfil de toxicidad sí se observan diferencias: la toxicidad hematológica se asocia más al 5-FU, mientras que efectos adversos como diarrea, náuseas y vómitos, y SMP están más asociados al tratamiento con capecitabina. Se ha demostrado que los polimorfismos C1236T, G2677T/A y C3435T en el gen *ABCB1* podrían ser biomarcadores de toxicidad en pacientes tratados con 5-FU o capecitabina. De esta manera, en un individuo homocigoto o heterocigoto para 1236T y 3435T, la ventaja del tratamiento con capecitabina resulta evidente, por el menor riesgo de neutropenia y SMP moderados-severos; si el paciente fuera homocigoto salvaje para este último polimorfismo, convendría que fuera tratado con 5-FU, dado el menor riesgo de sufrir diarrea moderada-severa.

De la misma forma, las diferencias entre el oxaliplatino y el irinotecan radican más en aspectos relacionados con su toxicidad que en cuestiones de eficacia. Así, el oxaliplatino produce frecuentemente neuropatía periférica, mientras que el irinotecan se asocia más a diarrea, neutropenia, y náuseas y vómitos. El polimorfismo Lys751Gln en *ERCC2* podría

servir para optar por un tratamiento basado en oxaliplatino u otro basado en irinotecan: si un paciente es portador del alelo variante para este polimorfismo podría beneficiarse de un tratamiento basado en oxaliplatino, por el menor riesgo de sufrir náuseas y vómitos severos durante el tratamiento; si por el contrario fuera homocigoto para el alelo salvaje, sería aconsejable que recibiera irinotecan, a causa de la menor probabilidad de desarrollar diarrea severa.

En definitiva, cualquier aspecto que contribuya a aumentar la seguridad del paciente ayudará a mejorar los resultados, no sólo en términos de seguridad propiamente dicha, sino también en cuanto a eficiencia y a la calidad de vida de los pacientes. La farmacogenética podría tener un papel destacado para lograrlo.

## **6.- CONCLUSIONES**



A continuación se exponen las conclusiones extraídas del presente trabajo:

1. Se han establecido las frecuencias genotípicas para polimorfismos potencialmente relevantes en el tratamiento quimioterápico del CCR en una población de pacientes del HGUGM. La mayoría de ellas son similares a las frecuencias descritas en HapMap para población caucásica; pero otras, como las halladas para *TYMS* 6del y *ABCB1* C3435T, son diferentes y reflejan particularidades genéticas de la península ibérica.
2. El grado de severidad de los efectos adversos a medicamentos considerado en los estudios de farmacogenética afecta directamente a las asociaciones obtenidas con las variaciones genéticas analizadas; esto podría explicar una gran parte de los resultados discrepantes encontrados en la literatura sobre farmacogenética de las reacciones adversas al tratamiento quimioterápico en CCR. Sería deseable en futuros estudios una mayor estandarización de las variables; en este sentido, agrupar a los pacientes por combinaciones de fármacos específicas ayudaría a obtener resultados más reproducibles.
3. Los polimorfismos C1236T, G2677T/A y C3435T del gen *ABCB1* son biomarcadores exploratorios de toxicidad diferencial a 5-FU y capecitabina y, de ser validados en cohortes más amplias, se podrían utilizar en clínica para decidir en qué fluoropirimidina basar el tratamiento. De la misma forma, el polimorfismo Lys751Gln en el gen *ERCC2* podría facilitar la elección de un tratamiento basado en oxaliplatino u otro basado en irinotecan.
4. Los polimorfismos *DPYD* A496G, *TYMS* 6del y USF E-box, *MTHFR* A1298C, *CDA* Lys27Gln, *ABCB1* C1236T, G2677T/A y C3435T, *ABCC4* A311G y T38G, *ERCC1* Asn118Asn, *ERCC2* Lys751Gln, *UGT1A1*\*28 y la variación del número de copias en *GSTT1* merecen evaluarse en una población mayor de pacientes de CCR; por el contrario, *MTHFR* C677T, *ABCC5* A1366C, *GSTP1* Ile105Val, *XRCC1* Gln399Arg, *EGFR* intrón 1 (CA)<sub>n</sub> y *UGT1A1*\*93 podrían ser descartados en futuros estudios farmacogenéticos de toxicidad a la quimioterapia en CCR.



## **7.- BIBLIOGRAFÍA**





1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90.
2. Center MM, Jemal A, Ward E. International trends in colorectal cancer incidence rates. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Jun;18(6):1688-94.
3. Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. Worldwide variations in colorectal cancer. *CA Cancer J Clin*. 2009 Nov-Dec;59(6):366-78.
4. Garcia-Alvarez A, Serra-Majem L, Ribas-Barba L, Castell C, Foz M, Uauy R, et al. Obesity and overweight trends in Catalonia, Spain (1992-2003): gender and socio-economic determinants. *Public Health Nutr*. 2007 Nov;10(11A):1368-78.
5. de Kok IM, Wong CS, Chia KS, Sim X, Tan CS, Kiemenev LA, et al. Gender differences in the trend of colorectal cancer incidence in Singapore, 1968-2002. *Int J Colorectal Dis*. 2008 May;23(5):461-7.
6. Sociedad Española de Oncología Médica. <http://www.seom.org/en/prensa/el-cancer-en-espanyacom/103644-el-cancer-en-espana-2012?showall=1>. [Acceso marzo 2013].
7. JANO.es Medicina y Humanidades. [http://www.jano.es/jano/actualidad/ultimas/noticias/janoes/preve/2015/haya/espana/alrededor/32000/nuevos/casos/cancer/colorrectal/f-11+iditem-18940+idtabla-1?utm\\_source=JANO&utm\\_medium=email&utm\\_campaign=Jano+diario+-+28%2F01%2F2013](http://www.jano.es/jano/actualidad/ultimas/noticias/janoes/preve/2015/haya/espana/alrededor/32000/nuevos/casos/cancer/colorrectal/f-11+iditem-18940+idtabla-1?utm_source=JANO&utm_medium=email&utm_campaign=Jano+diario+-+28%2F01%2F2013).
8. Edwards BK, Ward E, Kohler BA, Ehemann C, Zauberg AG, Anderson RN, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates. *Cancer*. 2010 Feb 1;116(3):544-73.
9. Chu KC, Tarone RE, Chow WH, Hankey BF, Ries LA. Temporal patterns in colorectal cancer incidence, survival, and mortality from 1950 through 1990. *J Natl Cancer Inst*. 1994 Jul 6;86(13):997-1006.
10. Mitry E, Bouvier AM, Esteve J, Faivre J. Benefit of operative mortality reduction on colorectal cancer survival. *Br J Surg*. 2002 Dec;89(12):1557-62.
11. Sant M, Capocaccia R, Coleman MP, Berrino F, Gatta G, Micheli A, et al. Cancer survival increases in Europe, but international differences remain wide. *Eur J Cancer*. 2001 Sep;37(13):1659-67.
12. Cunningham D, Atkin W, Lenz HJ, Lynch HT, Minsky B, Nordlinger B, et al. Colorectal cancer. *Lancet*. 2010 Mar 20;375(9719):1030-47.
13. Ferrari P, Jenab M, Norat T, Moskal A, Slimani N, Olsen A, et al. Lifetime and baseline alcohol intake and risk of colon and rectal cancers in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Int J Cancer*. 2007 Nov 1;121(9):2065-72.

14. Wu K, Giovannucci E, Byrne C, Platz EA, Fuchs C, Willett WC, et al. Meat mutagens and risk of distal colon adenoma in a cohort of U.S. men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Jun;15(6):1120-5.
15. Dai Z, Xu YC, Niu L. Obesity and colorectal cancer risk: a meta-analysis of cohort studies. *World J Gastroenterol.* 2007 Aug 21;13(31):4199-206.
16. Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, Rota M, Scotti L, Islami F, et al. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann Oncol.* 2011 Sep;22(9):1958-72.
17. Klein RS, Recco RA, Catalano MT, Edberg SC, Casey JL, Steigbigel NH. Association of *Streptococcus bovis* with carcinoma of the colon. *N Engl J Med.* 1977 Oct 13;297(15):800-2.
18. von Roon AC, Reese G, Teare J, Constantinides V, Darzi AW, Tekkis PP. The risk of cancer in patients with Crohn's disease. *Dis Colon Rectum.* 2007 Jun;50(6):839-55.
19. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut.* 2001 Apr;48(4):526-35.
20. McCullough ML, Robertson AS, Rodriguez C, Jacobs EJ, Chao A, Carolyn J, et al. Calcium, vitamin D, dairy products, and risk of colorectal cancer in the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort (United States). *Cancer Causes Control.* 2003 Feb;14(1):1-12.
21. Cho E, Smith-Warner SA, Spiegelman D, Beeson WL, van den Brandt PA, Colditz GA, et al. Dairy foods, calcium, and colorectal cancer: a pooled analysis of 10 cohort studies. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Jul 7;96(13):1015-22.
22. Aune D, Chan DS, Lau R, Vieira R, Greenwood DC, Kampman E, et al. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ.* 2011;343:d6617.
23. Ding EL, Mehta S, Fawzi WW, Giovannucci EL. Interaction of estrogen therapy with calcium and vitamin D supplementation on colorectal cancer risk: reanalysis of Women's Health Initiative randomized trial. *Int J Cancer.* 2008 Apr 15;122(8):1690-4.
24. Mauchley DC, Lynge DC, Langdale LA, Stelzner MG, Mock CN, Billingsley KG. Clinical utility and cost-effectiveness of routine preoperative computed tomography scanning in patients with colon cancer. *Am J Surg.* 2005 May;189(5):512-7; discussion 7.
25. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. Colon and rectum. eds.: *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer. 2010:143-164.
26. Guisado Barrilao R, López González A. Enfermedades del colon. En: De la Fuente Ramos M. *Enfermería Médico-Quirúrgica*. Vol. III. Colección *EnfermeríaS21*. 2ª ed. Madrid: Difusión Avances de Enfermería (DAE). 2009:1628-1647.
27. Nordlinger B, Sorbye H, Glimelius B, Poston GJ, Schlag PM, Rougier P, et al. Perioperative chemotherapy with FOLFOX4 and surgery versus surgery alone for resectable liver metastases from colorectal cancer (EORTC Intergroup trial 40983): a randomised controlled trial. *Lancet.* 2008 Mar 22;371(9617):1007-16.

28. Bosset JF, Collette L, Calais G, Mineur L, Maingon P, Radosevic-Jelic L, et al. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *N Engl J Med*. 2006 Sep 14;355(11):1114-23.
29. Gerard JP, Conroy T, Bonnetain F, Bouche O, Chapet O, Closon-Dejardin MT, et al. Preoperative radiotherapy with or without concurrent fluorouracil and leucovorin in T3-4 rectal cancers: results of FFCD 9203. *J Clin Oncol*. 2006 Oct 1;24(28):4620-5.
30. Sauer R, Becker H, Hohenberger W, Rodel C, Wittekind C, Fietkau R, et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med*. 2004 Oct 21;351(17):1731-40.
31. Chua W, Kho PS, Moore MM, Charles KA, Clarke SJ. Clinical, laboratory and molecular factors predicting chemotherapy efficacy and toxicity in colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011 Sep;79(3):224-50.
32. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ficha técnica: Fluorouracilo.  
<http://www.agemed.es/cima/especialidad.do?metodo=verFichaWordPdf&codigo=71868&formato=pdf&formulario=FICHAS&file=ficha.pdf>. [Acceso marzo 2013].
33. Raftery L, Goldberg RM. Optimal delivery of cytotoxic chemotherapy for colon cancer. *Cancer J*. 2010 May-Jun;16(3):214-9.
34. [No authors listed]. Efficacy of intravenous continuous infusion of fluorouracil compared with bolus administration in advanced colorectal cancer. Meta-analysis Group In Cancer. *J Clin Oncol*. 1998 Jan;16(1):301-8.
35. The Pharmacogenomics Knowledgebase. <http://www.pharmgkb.org>.
36. Petrelli N, Douglass HO, Jr., Herrera L, Russell D, Stablein DM, Bruckner HW, et al. The modulation of fluorouracil with leucovorin in metastatic colorectal carcinoma: a prospective randomized phase III trial. Gastrointestinal Tumor Study Group. *J Clin Oncol*. 1989 Oct;7(10):1419-26.
37. Poon MA, O'Connell MJ, Moertel CG, Wieand HS, Cullinan SA, Everson LK, et al. Biochemical modulation of fluorouracil: evidence of significant improvement of survival and quality of life in patients with advanced colorectal carcinoma. *J Clin Oncol*. 1989 Oct;7(10):1407-18.
38. Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R, Le Bail N, Faggiuolo R, Focan C, et al. Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2000 Jan;18(1):136-47.
39. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, Navarro M, James RD, Karasek P, et al. Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *Lancet*. 2000 Mar 25;355(9209):1041-7.
40. Kelly H, Goldberg RM. Systemic therapy for metastatic colorectal cancer: current options, current evidence. *J Clin Oncol*. 2005 Jul 10;23(20):4553-60.

41. Miwa M, Ura M, Nishida M, Sawada N, Ishikawa T, Mori K, et al. Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *Eur J Cancer*. 1998 Jul;34(8):1274-81.
42. Budman DR, Meropol NJ, Reigner B, Creaven PJ, Lichtman SM, Berghorn E, et al. Preliminary studies of a novel oral fluoropyrimidine carbamate: capecitabine. *J Clin Oncol*. 1998 May;16(5):1795-802.
43. Twelves C, Wong A, Nowacki MP, Abt M, Burris H, 3rd, Carrato A, et al. Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med*. 2005 Jun 30;352(26):2696-704.
44. Petrelli F, Cabiddu M, Barni S. 5-Fluorouracil or capecitabine in the treatment of advanced colorectal cancer: a pooled-analysis of randomized trials. *Med Oncol*. 2012 Jun;29(2):1020-9.
45. Raymond E, Faivre S, Woynarowski JM, Chaney SG. Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin Oncol*. 1998 Apr;25(2 Suppl 5):4-12.
46. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med*. 2004 Jun 3;350(23):2343-51.
47. Haller DG, Tabernero J, Maroun J, de Braud F, Price T, Van Cutsem E, et al. Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol*. 2011 Apr 10;29(11):1465-71.
48. Cassidy J, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, et al. Randomized phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid plus oxaliplatin as first-line therapy for metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Apr 20;26(12):2006-12.
49. Pommier Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2006 Oct;6(10):789-802.
50. Saltz LB, Niedzwiecki D, Hollis D, Goldberg RM, Hantel A, Thomas JP, et al. Irinotecan fluorouracil plus leucovorin is not superior to fluorouracil plus leucovorin alone as adjuvant treatment for stage III colon cancer: results of CALGB 89803. *J Clin Oncol*. 2007 Aug 10;25(23):3456-61.
51. Ychou M, Raoul JL, Douillard JY, Gourgou-Bourgade S, Bugat R, Mineur L, et al. A phase III randomised trial of LV5FU2 + irinotecan versus LV5FU2 alone in adjuvant high-risk colon cancer (FNCLCC Accord02/FFCD9802). *Ann Oncol*. 2009 Apr;20(4):674-80.
52. Van Cutsem E, Labianca R, Bodoky G, Barone C, Aranda E, Nordlinger B, et al. Randomized phase III trial comparing biweekly infusional fluorouracil/leucovorin alone or with irinotecan in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: PETACC-3. *J Clin Oncol*. 2009 Jul 1;27(19):3117-25.
53. Tournigand C, Andre T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol*. 2004 Jan 15;22(2):229-37.

54. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004 Jul 22;351(4):337-45.
55. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004 Jun 3;350(23):2335-42.
56. Wilke H, Glynne-Jones R, Thaler J, Adenis A, Preusser P, Aguilar EA, et al. Cetuximab plus irinotecan in heavily pretreated metastatic colorectal cancer progressing on irinotecan: MABEL Study. *J Clin Oncol*. 2008 Nov 20;26(33):5335-43.
57. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009 Apr 2;360(14):1408-17.
58. Folprecht G, Gruenberger T, Bechstein WO, Raab HR, Lordick F, Hartmann JT, et al. Tumour response and secondary resectability of colorectal liver metastases following neoadjuvant chemotherapy with cetuximab: the CELIM randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2010 Jan;11(1):38-47.
59. Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, Hartmann JT, Aparicio J, de Braud F, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Feb 10;27(5):663-71.
60. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2006 Apr 15;66(8):3992-5.
61. Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Apr 1;26(10):1626-34.
62. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol*. 2007 Apr 20;25(12):1539-44.
63. Braun MS, Richman SD, Thompson L, Daly CL, Meade AM, Adlard JW, et al. Association of molecular markers with toxicity outcomes in a randomized trial of chemotherapy for advanced colorectal cancer: the FOCUS trial. *J Clin Oncol*. 2009 Nov 20;27(33):5519-28.
64. European Medicines Agency. <http://www.ema.europa.eu/ema>.
65. Pfeiffer P, Mortensen JP, Bjerregaard B, Eckhoff L, Schønnemann K, Sandberg E, et al. Patient preference for oral or intravenous chemotherapy: a randomised cross-over trial comparing capecitabine and Nordic fluorouracil/leucovorin in patients with colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2006 Nov;42(16):2738-43.
66. de Gramont A, Bosset JF, Milan C, Rougier P, Bouche O, Etienne PL, et al. Randomized trial comparing monthly low-dose leucovorin and fluorouracil bolus with bimonthly high-

dose leucovorin and fluorouracil bolus plus continuous infusion for advanced colorectal cancer: a French intergroup study. *J Clin Oncol.* 1997 Feb;15(2):808-15.

67. Glimelius B, Sorbye H, Balteskard L, Bystrom P, Pfeiffer P, Tveit K, et al. A randomized phase III multicenter trial comparing irinotecan in combination with the Nordic bolus 5-FU and folinic acid schedule or the bolus/infused de Gramont schedule (Lv5FU2) in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2008 May;19(5):909-14.

68. El-Khoueiry AB, Lenz HJ. Should continuous infusion 5-fluorouracil become the standard of care in the USA as it is in Europe? *Cancer Invest.* 2006 Feb;24(1):50-5.

69. Di Francia R, Siesto RS, Valente D, Spart D, Berretta M. Pharmacogenomics panel test for prevention toxicity in patient who receive Fluoropirimidine/Oxaliplatin-based therapy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2012 Sep;16(9):1211-7.

70. Kadoyama K, Miki I, Tamura T, Brown JB, Sakaeda T, Okuno Y. Adverse event profiles of 5-fluorouracil and capecitabine: data mining of the public version of the FDA Adverse Event Reporting System, AERS, and reproducibility of clinical observations. *Int J Med Sci.* 2012;9(1):33-9.

71. Ibrahim A, Hirschfeld S, Cohen MH, Griebel DJ, Williams GA, Pazdur R. FDA drug approval summaries: oxaliplatin. *Oncologist.* 2004;9(1):8-12.

72. Berretta M, Taibi R, Bearz A, La Mura N, Berretta S, Tirelli U, et al. Dysphonia as an unusual toxic event of oxaliplatin-based chemotherapy. *J Chemother.* 2004 Dec;16(6):595-8.

73. Park SB, Lin CS, Krishnan AV, Goldstein D, Friedlander ML, Kiernan MC. Long-term neuropathy after oxaliplatin treatment: challenging the dictum of reversibility. *Oncologist.* 2011;16(5):708-16.

74. Hartmann JT, Lipp HP. Camptothecin and podophyllotoxin derivatives: inhibitors of topoisomerase I and II - mechanisms of action, pharmacokinetics and toxicity profile. *Drug Saf.* 2006;29(3):209-30.

75. Perez-Soler R, Saltz L. Cutaneous adverse effects with HER1/EGFR-targeted agents: is there a silver lining? *J Clin Oncol.* 2005 Aug 1;23(22):5235-46.

76. Grothey A, Sugrue MM, Purdie DM, Dong W, Sargent D, Hedrick E, et al. Bevacizumab beyond first progression is associated with prolonged overall survival in metastatic colorectal cancer: results from a large observational cohort study (BRiTE). *J Clin Oncol.* 2008 Nov 20;26(33):5326-34.

77. Motulsky AG. Drug reactions enzymes, and biochemical genetics. *J Am Med Assoc.* 1957 Oct 19;165(7):835-7.

78. Vogel F. Moderne probleme der Humangenetik. *Ergeb Inn Med Kinderheild.* 1959;12:52-125.

79. Definitions for genomic biomarkers, pharmacogenomics, pharmacogenetics, genomic data and sample coding categories. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500002880.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002880.pdf).

80. Ginsburg GS, Willard HF. Genomic and personalized medicine: foundations and applications. *Transl Res*. 2009 Dec;154(6):277-87.
81. Spear BB, Heath-Chiozzi M, Huff J. Clinical application of pharmacogenetics. *Trends Mol Med*. 2001 May;7(5):201-4.
82. Shastry BS. Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine. *Pharmacogenomics J*. 2006 Jan-Feb;6(1):16-21.
83. Garijo B et al. Hospitalizations because of drugs: a prospective study. *Rev Clin Esp*. 1991;188(1):7-12.
84. Whirl-Carrillo M, McDonagh EM, Hebert JM, Gong L, Sangkuhl K, Thorn CF, et al. Pharmacogenomics knowledge for personalized medicine. *Clin Pharmacol Ther*. 2012 Oct;92(4):414-7.
85. Evans WE, McLeod HL. Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med*. 2003 Feb 6;348(6):538-49.
86. Kalow W, Tang BK, Endrenyi L. Hypothesis: comparisons of inter- and intra-individual variations can substitute for twin studies in drug research. *Pharmacogenetics*. 1998 Aug;8(4):283-9.
87. Wheeler HE, Maitland ML, Dolan ME, Cox NJ, Ratain MJ. Cancer pharmacogenomics: strategies and challenges. *Nat Rev Genet*. 2013 Jan;14(1):23-34.
88. Weng L, Zhang L, Peng Y, Huang RS. Pharmacogenetics and pharmacogenomics: a bridge to individualized cancer therapy. *Pharmacogenomics*. 2013 Feb;14(3):315-24.
89. Check E. Human genome: patchwork people. *Nature*. 2005 Oct 20;437(7062):1084-6.
90. Hinds DA, Stuve LL, Nilsen GB, Halperin E, Eskin E, Ballinger DG, et al. Whole-genome patterns of common DNA variation in three human populations. *Science*. 2005 Feb 18;307(5712):1072-9.
91. Collins FS. Genome research: the next generation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2003;68:49-54.
92. Lubomirov R, Telenti A, Rotger M. [General concepts and study methods in pharmacogenetics]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008 May;26 Suppl 6:4-9.
93. Single Nucleotide Polymorphism database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>.
94. Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*. 1953 Apr 25;171(4356):737-8.
95. Chakravarti A. To a future of genetic medicine. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):822-3.
96. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001 Feb 16;291(5507):1304-51.



97. [No authors listed]. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004 Oct 21;431(7011):931-45.
98. International HapMap Project. <http://www.hapmap.org>.
99. Evans WE, Johnson JA. Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2001;2:9-39.
100. Sim SC, Kacevska M, Ingelman-Sundberg M. Pharmacogenomics of drug-metabolizing enzymes: a recent update on clinical implications and endogenous effects. *Pharmacogenomics J*. 2013 Feb;13(1):1-11.
101. Guengerich FP. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J*. 2006;8(1):E101-11.
102. Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature Committee <http://www.cypalleles.ki.se/>.
103. Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*. 1999 Oct 15;286(5439):487-91.
104. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst*. 2000 Aug 16;92(16):1295-302.
105. Dishy V, Sofowora GG, Xie HG, Kim RB, Byrne DW, Stein CM, et al. The effect of common polymorphisms of the beta2-adrenergic receptor on agonist-mediated vascular desensitization. *N Engl J Med*. 2001 Oct 4;345(14):1030-5.
106. Jacobsen P, Rossing K, Rossing P, Tarnow L, Mallet C, Poirier O, et al. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and ACE inhibition in diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 1998 Apr;53(4):1002-6.
107. Nebert DW, Zhang G, Vesell ES. From human genetics and genomics to pharmacogenetics and pharmacogenomics: past lessons, future directions. *Drug Metab Rev*. 2008;40(2):187-224.
108. Kiyotani K, Uno S, Mushiroda T, Takahashi A, Kubo M, Mitsuhashi N, et al. A genome-wide association study identifies four genetic markers for hematological toxicities in cancer patients receiving gemcitabine therapy. *Pharmacogenet Genomics*. 2012 Apr;22(4):229-35.
109. Fernandez-Rozadilla C, Cazier JB, Moreno V, Crous-Bou M, Guino E, Duran G, et al. Pharmacogenomics in colorectal cancer: a genome-wide association study to predict toxicity after 5-fluorouracil or FOLFOX administration. *Pharmacogenomics J*. 2012 Feb 7.
110. Won HH, Lee J, Park JO, Park YS, Lim HY, Kang WK, et al. Polymorphic markers associated with severe oxaliplatin-induced, chronic peripheral neuropathy in colon cancer patients. *Cancer*. 2012 Jun 1;118(11):2828-36.
111. Pinto N, Dolan ME. Clinically relevant genetic variations in drug metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab*. 2011 Jun;12(5):487-97.
112. Zhang W, Dolan ME. Impact of the 1000 genomes project on the next wave of pharmacogenomic discovery. *Pharmacogenomics*. 2010 Feb;11(2):249-56.

113. European Medicines Agency. European Public Assessment Reports: Cetuximab Product Information. [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000558/WC500029119.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000558/WC500029119.pdf). [Acceso marzo 2013].
114. European Medicines Agency. European Public Assessment Reports: Panitumumab Product Information. [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000741/WC500047710.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000741/WC500047710.pdf). [Acceso marzo 2013].
115. Diasio RB, Harris BE. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. Clin Pharmacokinet. 1989 Apr;16(4):215-37.
116. Gross E, Busse B, Riemenschneider M, Neubauer S, Seck K, Klein HG, et al. Strong association of a common dihydropyrimidine dehydrogenase gene polymorphism with fluoropyrimidine-related toxicity in cancer patients. PLoS One. 2008;3(12):e4003.
117. Table of US FDA-approved pharmacogenomic biomarkers in drug labels. <http://www.fda.gov/Drugs/ScienceResearch/ResearchAreas/Pharmacogenetics/ucm083378.htm>. [Acceso marzo 2013].
118. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ficha técnica: Capecitabina. [http://www.ema.europa.eu/docs/es\\_ES/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000316/WC500058151.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000316/WC500058151.pdf). [Acceso marzo 2013].
119. Johnson MR, Wang K, Diasio RB. Profound dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency resulting from a novel compound heterozygote genotype. Clin Cancer Res. 2002 Mar;8(3):768-74.
120. Danenberg PV. Thymidylate synthetase - a target enzyme in cancer chemotherapy. Biochim Biophys Acta. 1977 Dec 23;473(2):73-92.
121. Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. Cell Struct Funct. 1995 Jun;20(3):191-7.
122. Kawakami K, Salonga D, Park JM, Danenberg KD, Uetake H, Brabender J, et al. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression. Clin Cancer Res. 2001 Dec;7(12):4096-101.
123. Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A, et al. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. Pharmacogenomics J. 2001;1(1):65-70.
124. Mandola MV, Stoehlmacher J, Muller-Weeks S, Cesarone G, Yu MC, Lenz HJ, et al. A novel single nucleotide polymorphism within the 5' tandem repeat polymorphism of the thymidylate synthase gene abolishes USF-1 binding and alters transcriptional activity. Cancer Res. 2003 Jun 1;63(11):2898-904.
125. Kawakami K, Watanabe G. Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene. Cancer Res. 2003 Sep 15;63(18):6004-7.

126. Lincz LF, Scorgie FE, Garg MB, Ackland SP. Identification of a novel single nucleotide polymorphism in the first tandem repeat sequence of the thymidylate synthase 2R allele. *Int J Cancer*. 2007 May 1;120(9):1930-4.
127. Mandola MV, Stoehlmacher J, Zhang W, Groshen S, Yu MC, Iqbal S, et al. A 6 bp polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels. *Pharmacogenetics*. 2004 May;14(5):319-27.
128. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet*. 1995 May;10(1):111-3.
129. Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab*. 1998 Jul;64(3):169-72.
130. Caronia D, Martin M, Sastre J, de la Torre J, Garcia-Saenz JA, Alonso MR, et al. A polymorphism in the cytidine deaminase promoter predicts severe capecitabine-induced hand-foot syndrome. *Clin Cancer Res*. 2011 Apr 1;17(7):2006-13.
131. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1995;30(6):445-600.
132. Goto S, Iida T, Cho S, Oka M, Kohno S, Kondo T. Overexpression of glutathione S-transferase pi enhances the adduct formation of cisplatin with glutathione in human cancer cells. *Free Radic Res*. 1999 Dec;31(6):549-58.
133. Lecomte T, Landi B, Beaune P, Laurent-Puig P, Lloriot MA. Glutathione S-transferase P1 polymorphism (Ile105Val) predicts cumulative neuropathy in patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2006 May 15;12(10):3050-6.
134. Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Buolamwini J. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J Biol Chem*. 1997 Apr 11;272(15):10004-12.
135. Boige V, Mendiboure J, Pignon JP, Lloriot MA, Castaing M, Barrois M, et al. Pharmacogenetic assessment of toxicity and outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with LV5FU2, FOLFOX, and FOLFIRI: FFCD 2000-05. *J Clin Oncol*. 2010 May 20;28(15):2556-64.
136. Etienne-Grimaldi MC, Milano G, Maindrault-Goebel F, Chibaudel B, Formento JL, Francoual M, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms and FOLFOX response in colorectal cancer patients. *Br J Clin Pharmacol*. 2010 Jan;69(1):58-66.
137. Goekkurt E, Al-Batran SE, Hartmann JT, Mogck U, Schuch G, Kramer M, et al. Pharmacogenetic analyses of a phase III trial in metastatic gastroesophageal adenocarcinoma with fluorouracil and leucovorin plus either oxaliplatin or cisplatin: a

study of the arbeitgemeinschaft internistische onkologie. *J Clin Oncol*. 2009 Jun 10;27(17):2863-73.

138. Lunn RM, Helzlsouer KJ, Parshad R, Umbach DM, Harris EL, Sanford KK, et al. XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis*. 2000 Apr;21(4):551-5.

139. Yu JJ, Lee KB, Mu C, Li Q, Abernathy TV, Bostick-Bruton F, et al. Comparison of two human ovarian carcinoma cell lines (A2780/CP70 and MCAS) that are equally resistant to platinum, but differ at codon 118 of the ERCC1 gene. *Int J Oncol*. 2000 Mar;16(3):555-60.

140. Koc E, Caner V, Buyukpinarbasili N, Tepeli E, Turk NS, Ozan Cetin G, et al. The determination of relationship between "excision repair cross-complementing group 1" (ERCC1) gene T19007C and C8092A single nucleotide polymorphisms and clinicopathological parameters in non-small cell lung cancer. *Mol Biol Rep*. 2012 Jan;39(1):375-80.

141. Stoecklacher J, Ghaderi V, Iobal S, Groshen S, Tsao-Wei D, Park D, et al. A polymorphism of the XRCC1 gene predicts for response to platinum based treatment in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2001 Jul-Aug;21(4B):3075-9.

142. Kim ES, Khuri FR, Herbst RS. Epidermal growth factor receptor biology (IMC-C225). *Curr Opin Oncol*. 2001 Nov;13(6):506-13.

143. Gebhardt F, Burger H, Brandt B. Modulation of EGFR gene transcription by secondary structures, a polymorphic repetitive sequence and mutations--a link between genetics and epigenetics. *Histol Histopathol*. 2000 Jul;15(3):929-36.

144. Lenz HJ. Pharmacogenomics in colorectal cancer. *Semin Oncol*. 2003 Aug;30(4 Suppl 15):47-53.

145. Iyer L, King CD, Whittington PF, Green MD, Roy SK, Tephly TR, et al. Genetic predisposition to the metabolism of irinotecan (CPT-11). Role of uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes. *J Clin Invest*. 1998 Feb 15;101(4):847-54.

146. Ciotti M, Basu N, Brangi M, Owens IS. Glucuronidation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by the human UDP-glucuronosyltransferases encoded at the UGT1 locus. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Jun 24;260(1):199-202.

147. Gagne JF, Montminy V, Belanger P, Journault K, Gaucher G, Guillemette C. Common human UGT1A polymorphisms and the altered metabolism of irinotecan active metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38). *Mol Pharmacol*. 2002 Sep;62(3):608-17.

148. Hanioka N, Ozawa S, Jinno H, Ando M, Saito Y, Sawada J. Human liver UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in the glucuronidation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin. *Xenobiotica*. 2001 Oct;31(10):687-99.

149. Wasserman E, Myara A, Lokiec F, Goldwasser F, Trivin F, Mahjoubi M, et al. Severe CPT-11 toxicity in patients with Gilbert's syndrome: two case reports. *Ann Oncol*. 1997 Oct;8(10):1049-51.

150. Lampe JW, Bigler J, Horner NK, Potter JD. UDP-glucuronosyltransferase (UGT1A1\*28 and UGT1A6\*2) polymorphisms in Caucasians and Asians: relationships to serum bilirubin concentrations. *Pharmacogenetics*. 1999 Jun;9(3):341-9.
151. McLeod HL, Sargent DJ, Marsh S, Green EM, King CR, Fuchs CS, et al. Pharmacogenetic predictors of adverse events and response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer: results from North American Gastrointestinal Intergroup Trial N9741. *J Clin Oncol*. 2010 Jul 10;28(20):3227-33.
152. Glimelius B, Garmo H, Berglund A, Fredriksson LA, Berglund M, Kohnke H, et al. Prediction of irinotecan and 5-fluorouracil toxicity and response in patients with advanced colorectal cancer. *Pharmacogenomics J*. 2011 Feb;11(1):61-71.
153. Iyer L, Das S, Janisch L, Wen M, Ramirez J, Karrison T, et al. UGT1A1\*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity. *Pharmacogenomics J*. 2002;2(1):43-7.
154. Marcuello E, Altes A, Menoyo A, Del Rio E, Gomez-Pardo M, Baiget M. UGT1A1 gene variations and irinotecan treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2004 Aug 16;91(4):678-82.
155. Martinez-Balibrea E, Abad A, Martinez-Cardus A, Gines A, Valladares M, Navarro M, et al. UGT1A and TYMS genetic variants predict toxicity and response of colorectal cancer patients treated with first-line irinotecan and fluorouracil combination therapy. *Br J Cancer*. 2010 Aug 10;103(4):581-9.
156. Massacesi C, Terrazzino S, Marcucci F, Rocchi MB, Lippe P, Bisonni R, et al. Uridine diphosphate glucuronosyl transferase 1A1 promoter polymorphism predicts the risk of gastrointestinal toxicity and fatigue induced by irinotecan-based chemotherapy. *Cancer*. 2006 Mar 1;106(5):1007-16.
157. Rouits E, Charasson V, Petain A, Boisdron-Celle M, Delord JP, Fonck M, et al. Pharmacokinetic and pharmacogenetic determinants of the activity and toxicity of irinotecan in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer*. 2008 Oct 21;99(8):1239-45.
158. Innocenti F, Undevia SD, Iyer L, Chen PX, Das S, Kocherginsky M, et al. Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin Oncol*. 2004 Apr 15;22(8):1382-8.
159. Biason P, Masier S, Toffoli G. UGT1A1\*28 and other UGT1A polymorphisms as determinants of irinotecan toxicity. *J Chemother*. 2008 Apr;20(2):158-65.
160. Cecchin E, Innocenti F, D'Andrea M, Corona G, De Mattia E, Biason P, et al. Predictive role of the UGT1A1, UGT1A7, and UGT1A9 genetic variants and their haplotypes on the outcome of metastatic colorectal cancer patients treated with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan. *J Clin Oncol*. 2009 May 20;27(15):2457-65.
161. Cote JF, Kirzin S, Kramar A, Mosnier JF, Diebold MD, Soubeyran I, et al. UGT1A1 polymorphism can predict hematologic toxicity in patients treated with irinotecan. *Clin Cancer Res*. 2007 Jun 1;13(11):3269-75.

162. Kweekel DM, Gelderblom H, Van der Straaten T, Antonini NF, Punt CJ, Guchelaar HJ. UGT1A1\*28 genotype and irinotecan dosage in patients with metastatic colorectal cancer: a Dutch Colorectal Cancer Group study. *Br J Cancer*. 2008 Jul 22;99(2):275-82.
163. Liu CY, Chen PM, Chiou TJ, Liu JH, Lin JK, Lin TC, et al. UGT1A1\*28 polymorphism predicts irinotecan-induced severe toxicities without affecting treatment outcome and survival in patients with metastatic colorectal carcinoma. *Cancer*. 2008 May 1;112(9):1932-40.
164. Shulman K, Cohen I, Barnett-Griness O, Kuten A, Gruber SB, Lejbkowitz F, et al. Clinical implications of UGT1A1\*28 genotype testing in colorectal cancer patients. *Cancer*. 2011 Jul 15;117(14):3156-62.
165. Relling MV, Dervieux T. Pharmacogenetics and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2001 Nov;1(2):99-108.
166. Innocenti F, Kroetz DL, Schuetz E, Dolan ME, Ramirez J, Relling M, et al. Comprehensive pharmacogenetic analysis of irinotecan neutropenia and pharmacokinetics. *J Clin Oncol*. 2009 Jun 1;27(16):2604-14.
167. Hitzl M, Drescher S, van der Kuip H, Schaffeler E, Fischer J, Schwab M, et al. The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P-glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells. *Pharmacogenetics*. 2001 Jun;11(4):293-8.
168. Asano T, Takahashi KA, Fujioka M, Inoue S, Okamoto M, Sugiyama N, et al. ABCB1 C3435T and G2677T/A polymorphism decreased the risk for steroid-induced osteonecrosis of the femoral head after kidney transplantation. *Pharmacogenetics*. 2003 Nov;13(11):675-82.
169. Wang D, Johnson AD, Papp AC, Kroetz DL, Sadee W. Multidrug resistance polypeptide 1 (MDR1, ABCB1) variant 3435C>T affects mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics*. 2005 Oct;15(10):693-704.
170. Online application for the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE). <https://webapps.ctep.nci.nih.gov/webobjs/ctc/webhelp/whnjs.htm>.
171. Life Technologies. [www.lifetechnologies.com](http://www.lifetechnologies.com).
172. Online Encyclopedia for Genetic Epidemiology studies. <http://www.oege.org/>.
173. Cortejoso L, Lopez-Fernandez LA. Pharmacogenetic markers of toxicity for chemotherapy in colorectal cancer patients. *Pharmacogenomics*. 2012 Jul;13(10):1173-91.
174. Panczyk M, Balcerczak E, Piaskowski S, Jamroziak K, Pasz-Walczak G, Mirowski M. ABCB1 gene polymorphisms and haplotype analysis in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2009 Aug;24(8):895-905.
175. Chu XY, Suzuki H, Ueda K, Kato Y, Akiyama S, Sugiyama Y. Active efflux of CPT-11 and its metabolites in human KB-derived cell lines. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999 Feb;288(2):735-41.

176. Sai K, Kaniwa N, Itoda M, Saito Y, Hasegawa R, Komamura K, et al. Haplotype analysis of ABCB1/MDR1 blocks in a Japanese population reveals genotype-dependent renal clearance of irinotecan. *Pharmacogenetics*. 2003 Dec;13(12):741-57.
177. Chen ZS, Furukawa T, Sumizawa T, Ono K, Ueda K, Seto K, et al. ATP-Dependent efflux of CPT-11 and SN-38 by the multidrug resistance protein (MRP) and its inhibition by PAK-104P. *Mol Pharmacol*. 1999 May;55(5):921-8.
178. Ruzzo A, Graziano F, Loupakis F, Santini D, Catalano V, Bisonni R, et al. Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFIRI chemotherapy. *Pharmacogenomics J*. 2008 Aug;8(4):278-88.
179. Artac M, Bozcuk H, Pehlivan S, Akcan S, Pehlivan M, Sever T, et al. The value of XPD and XRCC1 genotype polymorphisms to predict clinical outcome in metastatic colorectal carcinoma patients with irinotecan-based regimens. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010 Jun;136(6):803-9.
180. Romero RZ, Morales R, Garcia F, Huarritz M, Bandres E, De la Haba J, et al. Potential application of GSTT1-null genotype in predicting toxicity associated to 5-fluorouracil irinotecan and leucovorin regimen in advanced stage colorectal cancer patients. *Oncol Rep*. 2006 Sep;16(3):497-503.
181. Ruzzo A, Graziano F, Loupakis F, Rulli E, Canestrari E, Santini D, et al. Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2007 Apr 1;25(10):1247-54.
182. Tan BR, Thomas F, Myerson RJ, Zehnbauser B, Trinkaus K, Malyapa RS, et al. Thymidylate synthase genotype-directed neoadjuvant chemoradiation for patients with rectal adenocarcinoma. *J Clin Oncol*. 2011 Mar 1;29(7):875-83.
183. Marcuello E, Paez D, Pare L, Salazar J, Sebio A, del Rio E, et al. A genotype-directed phase I-IV dose-finding study of irinotecan in combination with fluorouracil/leucovorin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2011 Jun 28;105(1):53-7.
184. Toffoli G, Cecchin E, Gasparini G, D'Andrea M, Azzarello G, Basso U, et al. Genotype-driven phase I study of irinotecan administered in combination with fluorouracil/leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Feb 10;28(5):866-71.
185. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Ficha técnica: Irinotecan. <http://www.agemed.es/cima/especialidad.do?metodo=verFichaWordPdf&codigo=70539&formato=pdf&formulario=FICHAS&file=ficha.pdf>. [Acceso marzo 2013].
186. Online access to WHO adverse reactions classification. [http://www.who.int/medicines/areas/quality\\_safety/safety\\_efficacy/advdrugreactions/en/](http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/safety_efficacy/advdrugreactions/en/).
187. Tsunoda A, Nakao K, Watanabe M, Matsui N, Ooyama A, Kusano M. Associations of various gene polymorphisms with toxicity in colorectal cancer patients receiving oral uracil and tegafur plus leucovorin: a prospective study. *Ann Oncol*. 2011 Feb;22(2):355-61.

188. Gonzalez-Haba E, Garcia MI, Cortejoso L, Lopez-Lillo C, Barrueco N, Garcia-Alfonso P, et al. ABCB1 gene polymorphisms are associated with adverse reactions in fluoropyrimidine-treated colorectal cancer patients. *Pharmacogenomics*. 2010 Dec;11(12):1715-23.
189. Kamil M, Haron M, Yosuff N, Khalid I, Azman N. High frequency of hand foot syndrome with capecitabine. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2010 Jun;20(6):421-2.
190. Alcoceba M, Marin L, Balanzategui A, Sarasquete ME, Chillon MC, Martin-Jimenez P, et al. Frequency of HLA-A, -B and -DRB1 specificities and haplotypic associations in the population of Castilla y Leon (northwest-central Spain). *Tissue Antigens*. 2011 Oct;78(4):249-55.
191. Longas J, Martinez-Laso J, Rey D, Areces C, Casado EG, Parga-Lozano C, et al. Las Alpujarras region (South East Spain) HLA genes study: evidence of a probable success of 17th century repopulation from North Spain. *Mol Biol Rep*. 2012 Feb;39(2):1387-94.
192. Mack SJ, Tu B, Yang R, Masaberg C, Ng J, Hurley CK. Human leukocyte antigen-A, -B, -C, -DRB1 allele and haplotype frequencies in Americans originating from southern Europe: contrasting patterns of population differentiation between Italian and Spanish Americans. *Hum Immunol*. 2011 Feb;72(2):144-9.
193. Alvarez S, Mesa MS, Bandres F, Arroyo E. C282Y and H63D mutation frequencies in a population from central Spain. *Dis Markers*. 2001;17(2):111-4.
194. Fonseca F, de la Torre R, Diaz L, Pastor A, Cuyas E, Pizarro N, et al. Contribution of cytochrome P450 and ABCB1 genetic variability on methadone pharmacokinetics, dose requirements, and response. *PLoS One*. 2011;6(5):e19527.
195. Henriquez-Hernandez LA, Murias-Rosales A, Gonzalez-Hernandez A, de Leon AC, Diaz-Chico N, Fernandez-Perez L. Distribution of TYMS, MTHFR, p53 and MDR1 gene polymorphisms in patients with breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy. *Cancer Epidemiol*. 2010 Oct;34(5):634-8.
196. Zintzaras E. Variance estimation of allele-based odds ratio in the absence of Hardy-Weinberg equilibrium. *Eur J Epidemiol*. 2008;23(5):323-6.
197. Schaid DJ, Jacobsen SJ. Biased tests of association: comparisons of allele frequencies when departing from Hardy-Weinberg proportions. *Am J Epidemiol*. 1999 Apr 15;149(8):706-11.
198. Lecomte T, Ferraz JM, Zinzindohoue F, Lorient MA, Tregouet DA, Landi B, et al. Thymidylate synthase gene polymorphism predicts toxicity in colorectal cancer patients receiving 5-fluorouracil-based chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2004 Sep 1;10(17):5880-8.
199. Afzal S, Gusella M, Vainer B, Vogel UB, Andersen JT, Broedbaek K, et al. Combinations of polymorphisms in genes involved in the 5-Fluorouracil metabolism pathway are associated with gastrointestinal toxicity in chemotherapy-treated colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2011 Jun 1;17(11):3822-9.
200. Chua W, Goldstein D, Lee CK, Dhillon H, Michael M, Mitchell P, et al. Molecular markers of response and toxicity to FOLFOX chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2009 Sep 15;101(6):998-1004.



201. Baird R, Biondo A, Chhaya V, McLachlan J, Karpathakis A, Rahman S, et al. Toxicity associated with capecitabine plus oxaliplatin in colorectal cancer before and after an institutional policy of capecitabine dose reduction. *Br J Cancer*. 2011 Jan 4;104(1):43-50.
202. Diaz-Rubio E, Gomez-Espana A, Massuti B, Sastre J, Abad A, Valladares M, et al. First-line XELOX plus bevacizumab followed by XELOX plus bevacizumab or single-agent bevacizumab as maintenance therapy in patients with metastatic colorectal cancer: the phase III MACRO TTD study. *Oncologist*. 2012;17(1):15-25.
203. Martling A, Granath F, Cedermark B, Johansson R, Holm T. Gender differences in the treatment of rectal cancer: a population based study. *Eur J Surg Oncol*. 2009 Apr;35(4):427-33.
204. Gordon MA, Zhang W, Yang D, Iqbal S, El-Khouiery A, Nagashima F, et al. Gender-specific genomic profiling in metastatic colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil and oxaliplatin. *Pharmacogenomics*. 2011 Jan;12(1):27-39.
205. Sanoff HK, Sargent DJ, Campbell ME, Morton RF, Fuchs CS, Ramanathan RK, et al. Five-year data and prognostic factor analysis of oxaliplatin and irinotecan combinations for advanced colorectal cancer: N9741. *J Clin Oncol*. 2008 Dec 10;26(35):5721-7.
206. Sargent DJ, Kohne CH, Sanoff HK, Bot BM, Seymour MT, de Gramont A, et al. Pooled safety and efficacy analysis examining the effect of performance status on outcomes in nine first-line treatment trials using individual data from patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Apr 20;27(12):1948-55.
207. Capitain O, Boisdron-Celle M, Poirier AL, Abadie-Lacourtoisie S, Morel A, Gamelin E. The influence of fluorouracil outcome parameters on tolerance and efficacy in patients with advanced colorectal cancer. *Pharmacogenomics J*. 2008 Aug;8(4):256-67.
208. McLeod HL, Sludden J, Murray GI, Keenan RA, Davidson AI, Park K, et al. Characterization of dihydropyrimidine dehydrogenase in human colorectal tumours. *Br J Cancer*. 1998;77(3):461-5.
209. van Kuilenburg AB, Muller EW, Haasjes J, Meinsma R, Zoetekouw L, Waterham HR, et al. Lethal outcome of a patient with a complete dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency after administration of 5-fluorouracil: frequency of the common IVS14+1G>A mutation causing DPD deficiency. *Clin Cancer Res*. 2001 May;7(5):1149-53.
210. Gonzalez-Haba E. [Severe capecitabine-associated toxicity in a patient carrying a mutation in the dihydropyrimidine dehydrogenase gen]. *Farm Hosp*. 2012 Nov;36(6):554-5.
211. Mattison LK, Soong R, Diasio RB. Implications of dihydropyrimidine dehydrogenase on 5-fluorouracil pharmacogenetics and pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*. 2002 Jul;3(4):485-92.
212. Gross E, Ullrich T, Seck K, Mueller V, de Wit M, von Schilling C, et al. Detailed analysis of five mutations in dihydropyrimidine dehydrogenase detected in cancer patients with 5-fluorouracil-related side effects. *Hum Mutat*. 2003 Dec;22(6):498.
213. van Kuilenburg AB, Haasjes J, Richel DJ, Zoetekouw L, Van Lenthe H, De Abreu RA, et al. Clinical implications of dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) deficiency in patients

with severe 5-fluorouracil-associated toxicity: identification of new mutations in the DPD gene. *Clin Cancer Res.* 2000 Dec;6(12):4705-12.

214. Takechi T, Okabe H, Ikeda K, Fujioka A, Nakagawa F, Ohshimo H, et al. Correlations between antitumor activities of fluoropyrimidines and DPD activity in lung tumor xenografts. *Oncol Rep.* 2005 Jul;14(1):33-9.

215. Ciccolini J, Mercier C, Evrard A, Dahan L, Boyer JC, Duffaud F, et al. A rapid and inexpensive method for anticipating severe toxicity to fluorouracil and fluorouracil-based chemotherapy. *Ther Drug Monit.* 2006 Oct;28(5):678-85.

216. Deenen MJ, Tol J, Burylo AM, Doodeman VD, de Boer A, Vincent A, et al. Relationship between single nucleotide polymorphisms and haplotypes in DPYD and toxicity and efficacy of capecitabine in advanced colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2011 May 15;17(10):3455-68.

217. Kleibl Z, Fidlerova J, Kleiblova P, Kormunda S, Bilek M, Bouskova K, et al. Influence of dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD) coding sequence variants on the development of fluoropyrimidine-related toxicity in patients with high-grade toxicity and patients with excellent tolerance of fluoropyrimidine-based chemotherapy. *Neoplasma.* 2009;56(4):303-16.

218. Swen JJ, Nijenhuis M, de Boer A, Grandia L, Maitland-van der Zee AH, Mulder H, et al. Pharmacogenetics: from bench to byte--an update of guidelines. *Clin Pharmacol Ther.* 2011 May;89(5):662-73.

219. Gusella M, Ferrazzi E, Padrini R. Classification of thymidylate synthase gene enhancer region polymorphisms. *Int J Cancer.* 2007 Dec 1;121(11):2580; author reply

220. Gusella M, Padrini R. G>C SNP of thymidylate synthase with respect to colorectal cancer. *Pharmacogenomics.* 2007 Aug;8(8):985-96.

221. Aschele C, Debernardis D, Casazza S, Antonelli G, Tunesi G, Baldo C, et al. Immunohistochemical quantitation of thymidylate synthase expression in colorectal cancer metastases predicts for clinical outcome to fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol.* 1999 Jun;17(6):1760-70.

222. Leichman CG, Lenz HJ, Leichman L, Danenberg K, Baranda J, Groshen S, et al. Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for disseminated colorectal cancer response and resistance to protracted-infusion fluorouracil and weekly leucovorin. *J Clin Oncol.* 1997 Oct;15(10):3223-9.

223. Kristensen MH, Pedersen PL, Melsen GV, Ellehaug J, Mejer J. Variants in the dihydropyrimidine dehydrogenase, methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase genes predict early toxicity of 5-fluorouracil in colorectal cancer patients. *J Int Med Res.* 2010 May-Jun;38(3):870-83.

224. Sharma R, Hoskins JM, Rivory LP, Zucknick M, London R, Liddle C, et al. Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and toxicity to capecitabine in advanced colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2008 Feb 1;14(3):817-25.

225. van Huis-Tanja LH, Gelderblom H, Punt CJ, Guchelaar HJ. MTHFR polymorphisms and capecitabine-induced toxicity in patients with metastatic colorectal cancer. *Pharmacogenet Genomics*. 2013 Apr;23(4):208-18.
226. Gusella M, Frigo AC, Bolzonella C, Marinelli R, Barile C, Bononi A, et al. Predictors of survival and toxicity in patients on adjuvant therapy with 5-fluorouracil for colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2009 May 19;100(10):1549-57.
227. Taflin H, Wettergren Y, Odin E, Carlsson G, Derwinger K. Gene polymorphisms MTHFR C677T and MTR A2756G as predictive factors in adjuvant chemotherapy for stage III colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2011 Sep;31(9):3057-62.
228. Lee KH, Chang HJ, Han SW, Oh DY, Im SA, Bang YJ, et al. Pharmacogenetic analysis of adjuvant FOLFOX for Korean patients with colon cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013 Jan 13.
229. Farrell JJ, Bae K, Wong J, Guha C, Dicker AP, Elsaleh H. Cytidine deaminase single-nucleotide polymorphism is predictive of toxicity from gemcitabine in patients with pancreatic cancer: RTOG 9704. *Pharmacogenomics J*. 2011 Oct;12(5):395-403.
230. Evrard A, Lacarelle B, Ciccolini J. Severe or lethal toxicities with nucleosidic analogs: time for action. *Pharmacogenomics*. 2013 Feb;14(3):227-30.
231. Ciccolini J, Evrard A, Lacarelle B. A CDD polymorphism as predictor of capecitabine-induced hand-foot syndrome--letter. *Clin Cancer Res*. 2012 Jan 1;18(1):317.
232. Jansen WJ, Hulscher TM, van Ark-Otte J, Giaccone G, Pinedo HM, Boven E. CPT-11 sensitivity in relation to the expression of P170-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein. *Br J Cancer*. 1998;77(3):359-65.
233. Romsicki Y, Sharom FJ. The ATPase and ATP-binding functions of P-glycoprotein--modulation by interaction with defined phospholipids. *Eur J Biochem*. 1998 Aug 15;256(1):170-8.
234. Kim RB, Leake BF, Choo EF, Dresser GK, Kubba SV, Schwarz UI, et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther*. 2001 Aug;70(2):189-99.
235. Han JY, Lim HS, Yoo YK, Shin ES, Park YH, Lee SY, et al. Associations of ABCB1, ABCC2, and ABCG2 polymorphisms with irinotecan-pharmacokinetics and clinical outcome in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer*. 2007 Jul 1;110(1):138-47.
236. Rhodes KE, Zhang W, Yang D, Press OA, Gordon M, Vallbohmer D, et al. ABCB1, SLC01B1 and UGT1A1 gene polymorphisms are associated with toxicity in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line irinotecan. *Drug Metab Lett*. 2007 Jan;1(1):23-30.
237. Lin JH, Yamazaki M. Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications. *Clin Pharmacokinet*. 2003;42(1):59-98.
238. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence

variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 28;97(7):3473-8.

239. Hagmann W, Jesnowski R, Faissner R, Guo C, Lohr JM. ATP-binding cassette C transporters in human pancreatic carcinoma cell lines. Upregulation in 5-fluorouracil-resistant cells. *Pancreatology*. 2009;9(1-2):136-44.

240. Yuan J, Lv H, Peng B, Wang C, Yu Y, He Z. Role of BCRP as a biomarker for predicting resistance to 5-fluorouracil in breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009 May;63(6):1103-10.

241. Huang MY, Fang WY, Lee SC, Cheng TL, Wang JY, Lin SR. ERCC2 2251A>C genetic polymorphism was highly correlated with early relapse in high-risk stage II and stage III colorectal cancer patients: a preliminary study. *BMC Cancer*. 2008;8:50.

242. De Iudicibus S, De Pellegrin A, Stocco G, Bartoli F, Bussani R, Decorti G. ABCB1 gene polymorphisms and expression of P-glycoprotein and long-term prognosis in colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2008 Nov-Dec;28(6B):3921-8.

243. Moosmann N, von Weikersthal LF, Vehling-Kaiser U, Stauch M, Hass HG, Dietzfelbinger H, et al. Cetuximab plus capecitabine and irinotecan compared with cetuximab plus capecitabine and oxaliplatin as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer: AIO KKR-0104--a randomized trial of the German AIO CRC study group. *J Clin Oncol*. 2011 Mar 10;29(8):1050-8.

244. Caussanel JP, Levi F, Brienza S, Misset JL, Itzhaki M, Adam R, et al. Phase I trial of 5-day continuous venous infusion of oxaliplatin at circadian rhythm-modulated rate compared with constant rate. *J Natl Cancer Inst*. 1990 Jun 20;82(12):1046-50.

245. Argyriou AA, Velasco R, Briani C, Cavaletti G, Bruna J, Alberti P, et al. Peripheral neurotoxicity of oxaliplatin in combination with 5-fluorouracil (FOLFOX) or capecitabine (XELOX): a prospective evaluation of 150 colorectal cancer patients. *Ann Oncol*. 2012 Dec;23(12):3116-22.

246. Chen YC, Tzeng CH, Chen PM, Lin JK, Lin TC, Chen WS, et al. Influence of GSTP1 I105V polymorphism on cumulative neuropathy and outcome of FOLFOX-4 treatment in Asian patients with colorectal carcinoma. *Cancer Sci*. 2010 Feb;101(2):530-5.

247. Pare L, Marcuello E, Altes A, del Rio E, Sedano L, Salazar J, et al. Pharmacogenetic prediction of clinical outcome in advanced colorectal cancer patients receiving oxaliplatin/5-fluorouracil as first-line chemotherapy. *Br J Cancer*. 2008 Oct 7;99(7):1050-5.

248. Kweekel DM, Koopman M, Antonini NF, Van der Straaten T, Nortier JW, Gelderblom H, et al. GSTP1 Ile105Val polymorphism correlates with progression-free survival in MCRC patients treated with or without irinotecan: a study of the Dutch Colorectal Cancer Group. *Br J Cancer*. 2008 Oct 21;99(8):1316-21.

249. Kweekel DM, Gelderblom H, Antonini NF, Van der Straaten T, Nortier JW, Punt CJ, et al. Glutathione-S-transferase pi (GSTP1) codon 105 polymorphism is not associated with oxaliplatin efficacy or toxicity in advanced colorectal cancer patients. *Eur J Cancer*. 2009 Mar;45(4):572-8.

250. Inada M, Sato M, Morita S, Kitagawa K, Kawada K, Mitsuma A, et al. Associations between oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and polymorphisms of the ERCC1 and GSTP1 genes. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2010 Nov;48(11):729-34.
251. Agostini M, Pasetto LM, Pucciarelli S, Terrazzino S, Ambrosi A, Bedin C, et al. Glutathione S-transferase P1 Ile105Val polymorphism is associated with haematological toxicity in elderly rectal cancer patients receiving preoperative chemoradiotherapy. *Drugs Aging*. 2008;25(6):531-9.
252. Chang PM, Tzeng CH, Chen PM, Lin JK, Lin TC, Chen WS, et al. ERCC1 codon 118 C-->T polymorphism associated with ERCC1 expression and outcome of FOLFOX-4 treatment in Asian patients with metastatic colorectal carcinoma. *Cancer Sci*. 2009 Feb;100(2):278-83.
253. Sung P, Bailly V, Weber C, Thompson LH, Prakash L, Prakash S. Human xeroderma pigmentosum group D gene encodes a DNA helicase. *Nature*. 1993 Oct 28;365(6449):852-5.
254. Wolfe KJ, Wickliffe JK, Hill CE, Paolini M, Ammenheuser MM, Abdel-Rahman SZ. Single nucleotide polymorphisms of the DNA repair gene XPD/ERCC2 alter mRNA expression. *Pharmacogenet Genomics*. 2007 Nov;17(11):897-905.
255. Lai JI, Tzeng CH, Chen PM, Lin JK, Lin TC, Chen WS, et al. Very low prevalence of XPD K751Q polymorphism and its association with XPD expression and outcomes of FOLFOX-4 treatment in Asian patients with colorectal carcinoma. *Cancer Sci*. 2009 Jul;100(7):1261-6.
256. Duell EJ, Wiencke JK, Cheng TJ, Varkonyi A, Zuo ZF, Ashok TD, et al. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis*. 2000 May;21(5):965-71.
257. Wang Z, Xu B, Lin D, Tan W, Leaw S, Hong X, et al. XRCC1 polymorphisms and severe toxicity in lung cancer patients treated with cisplatin-based chemotherapy in Chinese population. *Lung Cancer*. 2008 Oct;62(1):99-104.
258. Zhang W, Park DJ, Lu B, Yang DY, Gordon M, Groshen S, et al. Epidermal growth factor receptor gene polymorphisms predict pelvic recurrence in patients with rectal cancer treated with chemoradiation. *Clin Cancer Res*. 2005 Jan 15;11(2 Pt 1):600-5.
259. Rougier P, Van Cutsem E, Bajetta E, Niederle N, Possinger K, Labianca R, et al. Randomised trial of irinotecan versus fluorouracil by continuous infusion after fluorouracil failure in patients with metastatic colorectal cancer. *Lancet*. 1998 Oct 31;352(9138):1407-12.
260. Sai K, Saeki M, Saito Y, Ozawa S, Katori N, Jinno H, et al. UGT1A1 haplotypes associated with reduced glucuronidation and increased serum bilirubin in irinotecan-administered Japanese patients with cancer. *Clin Pharmacol Ther*. 2004 Jun;75(6):501-15.
261. Mathijssen RH, Marsh S, Karlsson MO, Xie R, Baker SD, Verweij J, et al. Irinotecan pathway genotype analysis to predict pharmacokinetics. *Clin Cancer Res*. 2003 Aug 15;9(9):3246-53.

262. Paoluzzi L, Singh AS, Price DK, Danesi R, Mathijssen RH, Verweij J, et al. Influence of genetic variants in UGT1A1 and UGT1A9 on the in vivo glucuronidation of SN-38. *J Clin Pharmacol*. 2004 Aug;44(8):854-60.
263. Stewart CF, Panetta JC, O'Shaughnessy MA, Throm SL, Fraga CH, Owens T, et al. UGT1A1 promoter genotype correlates with SN-38 pharmacokinetics, but not severe toxicity in patients receiving low-dose irinotecan. *J Clin Oncol*. 2007 Jun 20;25(18):2594-600.
264. Toffoli G, Cecchin E, Corona G, Russo A, Buonadonna A, D'Andrea M, et al. The role of UGT1A1\*28 polymorphism in the pharmacodynamics and pharmacokinetics of irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Jul 1;24(19):3061-8.
265. Hoskins JM, Goldberg RM, Qu P, Ibrahim JG, McLeod HL. UGT1A1\*28 genotype and irinotecan-induced neutropenia: dose matters. *J Natl Cancer Inst*. 2007 Sep 5;99(17):1290-5.
266. Schulz C, Heinemann V, Schalhorn A, Moosmann N, Zwingers T, Boeck S, et al. UGT1A1 gene polymorphism: impact on toxicity and efficacy of irinotecan-based regimens in metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2009 Oct 28;15(40):5058-66.
267. Davies SM, Robison LL, Buckley JD, Tjoa T, Woods WG, Radloff GA, et al. Glutathione S-transferase polymorphisms and outcome of chemotherapy in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2001 Mar 1;19(5):1279-87.
268. Naoe T, Tagawa Y, Kiyoi H, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, et al. Prognostic significance of the null genotype of glutathione S-transferase-T1 in patients with acute myeloid leukemia: increased early death after chemotherapy. *Leukemia*. 2002 Feb;16(2):203-8.
269. Sweeney C, Nazar-Stewart V, Stapleton PL, Eaton DL, Vaughan TL. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms and survival among lung cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003 Jun;12(6):527-33.
270. Zhang YW, Regairaz M, Seiler JA, Agama KK, Doroshow JH, Pommier Y. Poly(ADP-ribose) polymerase and XPF-ERCC1 participate in distinct pathways for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*. 2011 May;39(9):3607-20.



## **8.- ANEXOS**





## ANEXO 1

### **Documento de Información al Paciente para la obtención de muestras del estudio farmacogenético “Polimorfismos genéticos asociados a las reacciones adversas al tratamiento en pacientes con cáncer colorrectal”**

Por favor, lea este documento con atención y no dude en preguntar al personal del centro cualquier duda sobre este documento o sobre la información que se proporciona a continuación.

#### INTRODUCCIÓN/PROPÓSITO

Se le invita a participar en este estudio de investigación llamado “Polimorfismos genéticos asociados a las reacciones adversas al tratamiento en pacientes con cáncer colorrectal”. Su participación en este estudio es completamente voluntaria, y si usted decide no participar, esto no afectará al tratamiento que usted recibe. El estudio farmacogenético es el estudio de las diferencias genéticas individuales y su relación con la forma en que un paciente y su enfermedad (tumor) responden al tratamiento farmacológico. Al igual que los genes heredados de sus padres influyen en el color de los ojos, color de pelo y estructura corporal, las diferencias en el material genético heredado de sus padres también puede desempeñar un papel en la forma en la que su organismo y el tumor pueden responder al tratamiento.

Se le solicita que proporcione una muestra de sangre para evaluar el ADN (su información genética) de sus leucocitos. Esto permitirá un estudio de genes importantes implicados en el metabolismo de su cuerpo (descomposición, uso y eliminación del fármaco del estudio) y otros rasgos genéticos que podrían predecir la forma en la que su tumor se verá afectado por el tratamiento farmacológico. Este proceso se llama “genotipado”.

Esta muestra que usted proporcione se usará con propósitos de control y para crear una base de datos (listado) de los rasgos genéticos que podrían ayudar a predecir cómo el organismo responde a ciertos fármacos. Usted no recibirá ningún beneficio médico directo al proporcionar esta muestra de sangre. Sin embargo, su participación en este estudio formará parte de un esfuerzo para recopilar información adicional sobre cómo los enfermos y sus tumores responden al tratamiento farmacológico. Esta información podría beneficiar a futuros pacientes que tengan un cáncer parecido y ayudar al desarrollo de nuevos fármacos o a mejorar los fármacos ya existentes.

No hay costes añadidos para usted por la extracción de la muestra de sangre. Este estudio no requiere que usted tome ningún fármaco que no le haya sido prescrito por su médico.

#### DESCRIPCIÓN

Su participación en este estudio de genotipado se limita a:

La extracción de una sola muestra de sangre, que se realizará en cualquier momento del estudio, por ejemplo cuando haya que extraerle sangre para una analítica de revisión. La muestra de sangre se extraerá a través de una venopunción directa (inserción de una aguja en la vena) y se extraerán, aproximadamente, 3 mL. De esta muestra de sangre se extraerá el ADN para su estudio.

No se tomarán decisiones terapéuticas basadas en el resultado mientras la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios no regule la utilidad de dicho análisis en el uso de los medicamentos.

#### POSIBLES RIESGOS EN LA EXTRACCION DE UNA MUESTRA DE SANGRE

En este estudio se realizará la extracción de una muestra de sangre. Usted podría experimentar un ligero dolor, molestia, irritación, hemorragia y, en casos poco frecuentes, infección en el lugar en que se hizo la extracción. Algunas personas pueden experimentar mareo y desmayarse durante la extracción de sangre.

#### CONFIDENCIALIDAD

La información recopilada durante el estudio será confidencial. Siguiendo lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, sus datos serán tratados con la más rigurosa confidencialidad y su identidad permanecerá en el anonimato. No se le identificará de modo personalizado en ningún informe final. Los resultados del estudio pueden ser publicados en revistas médicas. Sin embargo, su nombre no aparecerá en ningún documento. En las muestras se aplicará un código que no permite extraer información sobre la identidad o la patología del paciente. Los análisis de sangre se archivarán de manera segura según lo dispuesto en la Ley 15/1999.

#### ACEPTACIÓN

Usted entiende que:

Se obtendrá material genético (ADN) de las muestras de sangre que usted proporcione para el análisis genotípico (como ya se ha descrito). El ADN obtenido será almacenado y conservado a bajas temperaturas, en un lugar seguro y de acceso restringido. Durante el estudio, su ADN podrá ser analizado para valorar la presencia de alteraciones genéticas que afecten a la respuesta a los medicamentos usados en el tratamiento del cáncer colorrectal y sólo para ese fin. Podrá solicitar los resultados obtenidos con su muestra.

#### MUESTRAS

Las muestras de sangre, una vez extraídas serán enviadas al Laboratorio de Farmacogenética y Farmacogenómica del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, donde serán almacenadas de acuerdo con la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica. Las muestras se almacenarán en dicho laboratorio hasta dos años después de finalizar el estudio, siendo posteriormente anonimizadas (destruyendo el código que mantiene las muestras identificables). El acceso a las muestras estará restringido al personal del Laboratorio de Farmacogenética y Farmacogenómica del Servicio de Farmacia del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, siendo éste un lugar seguro.

Las muestras no serán cedidas a terceros sin consentimiento escrito del paciente.

Las muestras no podrán ser comercializadas.

## RETIRADA DEL CONSENTIMIENTO

Si usted decide en cualquier momento (después del análisis) que quiere retirar su consentimiento relacionado con su muestra de sangre, deberá enviar una solicitud por escrito a:

Laboratorio de Farmacogenética y Farmacogenómica  
Servicio de Farmacia  
Hospital General Universitario Gregorio Marañón  
C/Dr. Esquerdo 46  
28007, Madrid

para que se destruya su muestra de ADN, así como sus identificadores personales.

## COMPENSACIÓN

Usted no recibirá ninguna compensación económica (pago) por participar en este estudio ni por la donación de la muestra de sangre.

## CONSENTIMIENTO

Firmando este consentimiento, usted indica que ha leído este documento de consentimiento informado por escrito y que acepta libremente proporcionar una muestra de sangre para la evaluación farmacogenética.

Firmando este consentimiento, usted indica que comprende:

- La naturaleza de este estudio farmacogenético
- Que usted participa voluntariamente
- Que la extracción de una muestra de sangre puede estar asociada a efectos adversos, algunos de los cuales se desconocen
- Que usted puede limitar el uso de la muestra o retirarla sin penalización o pérdida de los beneficios a los que tiene derecho.
- Que, firmando este documento de consentimiento, usted no renuncia a ninguno de los derechos legales como voluntario.

Firmando este consentimiento usted indica que se le ha informado durante cuánto tiempo y con qué métodos se llevará a cabo el estudio, y que se le ha recordado que usted tiene la oportunidad de realizar más preguntas sobre los detalles y procedimientos del estudio. Todas sus preguntas se han contestado a su entera satisfacción.

## CERTIFICADO

Usted, que tiene una edad igual o superior a los 18 años, que participará en el estudio “Polimorfismos genéticos asociados a las reacciones adversas al tratamiento en pacientes con cáncer colorrectal”, y que no tiene problemas médicos de los que no haya informado al médico del estudio, certifica que comprende lo que conlleva su participación en este estudio, como se ha indicado antes. Su firma a continuación, certifica que usted comprende la investigación que se le ha explicado en este documento.

## ANEXO 2

### **Documento de Consentimiento del Paciente para la obtención de muestras del estudio farmacogenético “Polimorfismos genéticos asociados a las reacciones adversas al tratamiento en pacientes con cáncer colorrectal”**

#### FIRMAS

Con el presente documento autorizo a que se me haga un análisis de sensibilidad genética a los fármacos que se utilizarán en el tratamiento de mi enfermedad tumoral de colon. El análisis se hará a partir de una muestra de sangre que me tomarán en el mismo momento que los controles rutinarios. No se tomarán decisiones terapéuticas basadas en el resultado mientras la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios no regule la utilidad de dicho análisis en el uso de los medicamentos.

Todos los datos obtenidos serán confidenciales. Se me informará de los resultados si así lo solicito. Asimismo, podré retirar mi autorización en cualquier momento.

Yo, D/D<sup>a</sup> \_\_\_\_\_, tras haber recibido información del Dr/ Dra \_\_\_\_\_ sobre el significado, empleo en la práctica diaria y el objetivo del análisis, le/la autorizo para la extracción de una muestra sérica.

En Madrid, a \_\_\_\_\_

Fdo:

Paciente

Médico

## ANEXO 3

## REVIEW



## Pharmacogenetic markers of toxicity for chemotherapy in colorectal cancer patients

Chemotherapeutic agents used in colorectal cancer are frequently associated with severe adverse reactions that compromise the efficacy of treatment. Predicting toxicity could enable therapy to be tailored. Genetic variations have been associated with toxicity in patients treated with fluoropyrimidines (5-fluorouracil, capecitabine and tegafur), oxaliplatin, irinotecan and cetuximab. Complexity of treatment and variability in toxicity classifications make it difficult to compare studies. This article analyzes the association between toxicity and polymorphisms in *DPYD*, *TYMS*, *MTHFR*, *ABCB1*, *UGT1A1*, *ERCC1*, *ERCC2*, *XRCC1*, *GSTT1* and *GSTM1*. In addition, the state-of-the-art and future perspectives are discussed.

**KEYWORDS:** adverse reactions • cancer • colon • pharmacogenetics • rectum

The literature on the efficacy of treatment is relatively free of ambiguity. Overall, disease-free and progression-free survival are concepts that do not allow for interpretation. Other areas are more conflictive, for example tumor grade, treatment and statistical approach, all of which need to be standardized before results can be compared. Studies on toxicity are even more difficult to compare, owing to three additional factors:

- Criteria for adverse events; two sources are used to classify adverse events associated with treatment: the Common Terminology Criteria for Adverse Events, now in version 3.0 [201], and the WHO adverse reaction terminology [202];
- The cutoff for grading an adverse drug reaction (ADR) varies between studies, and a drug is considered toxic at grades >1 [1,2], >2 [3] and >3 [4]. Cutoff is further complicated by the use of additional criteria, such as delay in cycle or dose reduction caused by an ADR [5,6];
- Very often, the focus is on efficacy and not on the type of toxicity; authors often only refer to 'genotypes associated or not associated with toxicity', thus making it impossible to know which toxicities were analyzed.

Consequently, it is difficult to compare the pharmacogenetics of ADRs with chemotherapy in general and with that used in colorectal cancer (CRC) in particular [7].

As many studies focus on efficacy and treat toxicity as a secondary aspect, protocols aimed at detecting associations between genotype and response rarely examine toxicity to chemotherapy and lack detailed information on ADRs.

The difficulty in discovering biomarkers of ADRs is clear from the fact that only six of the 29 biomarkers for oncology are approved by the US FDA, are associated with toxicity, and only two of these can be applied to drugs used in CRC chemotherapy, namely *DPYD*\*2A for capecitabine and *UGT1A1*\*28 for irinotecan [203]. Furthermore, to the authors' knowledge, these markers are not extensively used in clinical practice.

This article presents the principal findings on associations between genotypes and adverse reactions to the drugs most frequently used to treat CRC. It is shown that we are far from being able to implement pharmacogenetic testing to prevent ADRs to CRC chemotherapy, and a large consortium with standardized protocols and analysis is necessary if we are to advance in this field.

### CRC & chemotherapy

CRC is the second most common cancer among women after breast cancer and the third among men after lung and prostate cancers, with over 1.2 million new cases and 608,700 estimated deaths in 2008 [7].

Capecitabine and 5-fluorouracil (5-FU) remain the cornerstone of first-line systemic chemotherapy in patients with CRC. 5-FU acts by inhibiting the enzyme TYMS and is used in combination with folinic acid, which boosts its inhibitory effect. Regimens comprising bolus/infusional 5-FU, folinic acid modulation and oxaliplatin (FOLFOX) or irinotecan (FOLFIRI) have become the most common first-line treatments for metastatic disease [8]. Oxaliplatin inhibits replication and transcription

Lucía Cortejo<sup>1,2</sup> & Luis A López-Fernández<sup>\*1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Pharmacogenetics & Pharmacogenomics, Pharmacy Department, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Doctor Esquerdo 46, 28007 Madrid, Spain

<sup>2</sup>Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Doctor Esquerdo 46, 28007 Madrid, Spain

\*Author for correspondence:  
Tel.: +34 914 265 026  
llopezf.hgugm@gmail.com

Future  
Medicine  part of 

of DNA by binding to DNA and RNA, thus inducing apoptosis [9]. Irinotecan inhibits topoisomerase I, resulting in transcription errors with subsequent inhibition of cell proliferation [10].

CRC treatment has evolved over the last decade in the form of active chemotherapeutic agents and targeted monoclonal antibodies. The combination of new monoclonal antibodies, such as cetuximab and panitumumab (anti-EGF receptors [EGFRs]) or bevacizumab (anti-VEGF), has improved patient outcome at the cost of more severe toxicity, and not all patients benefit from these drugs [11].

### ADRs to chemotherapeutic agents used in CRC

Most CRC patients experience mild or moderate toxicity at some point during treatment; however, a significant minority develops severe toxicity that can lead to dose reductions or delays in administration. At worst, toxicity can be fatal [11]. The toxicity of chemotherapeutic drugs is influenced by nongenetic factors such as age, performance status, organ dysfunction and other patient comorbidities, although genetic variability may also play an important role [5].

Box 1 summarizes very common ADRs (frequency of  $\geq 10\%$ ) to 5-FU, capecitabine, FOLFOX and irinotecan [204]. Hematological and gastrointestinal toxicity are common to all drugs, while several ADRs are drug specific; for example capecitabine-induced hand-foot syndrome or oxaliplatin-induced neuropathy. Irinotecan causes severe diarrhea and neutropenia in 20–35% of patients [12,13], and even fatal reactions have been reported [14].

Toxicity associated with 5-FU treatment depends on dose, schedule, route of administration and whether the 5-FU is combined with folinic acid. In the USA, the Mayo regimen has been the standard for many years [15]. However, randomized trials have shown that other regimens have comparable efficacy with less toxicity. For example, the de Gramont regimen shows significantly reduced rates of diarrhea, mucositis and neutropenia compared with the Mayo regimen [16], and also reduced rates of grade 3/4 neutropenia and grade 2 alopecia compared with the Nordic schedule with irinotecan [17]. A meta-analysis shows a different toxicity profile for continuous infusion 5-FU that is generally more favorable than bolus infusion [18].

Although capecitabine is a prodrug of 5-FU, its toxicological profile is quite different. Hematological ADRs (leukopenia, thrombocytopenia and neutropenia) have been more

frequently associated with 5-FU, normally on the Mayo regimen, than with capecitabine, whereas diarrhea, nausea, vomiting and hand-foot syndrome have been more frequently associated with capecitabine [19]. However, pharmacogenetic analyses commonly mix patients treated with 5-FU and capecitabine, thus losing very important information for statistical associations between the ADR and the specific drug [6]. The authors' group identified for the first time pharmacogenetic biomarkers for ADRs to capecitabine but not 5-FU, and for 5-FU but not capecitabine, thus reflecting a nondefined differential mechanism for induced toxicity by these drugs [2].

### Pharmacogenetics of ADRs induced by fluoropyrimidines (5-FU/capecitabine/tegafur)

#### ■ *DPYD*

The *DPYD* gene is a key player in the catabolism of fluoropyrimidines. 5-FU must be metabolized in order to exert its antitumoral properties. However, more than 80% of the drug is quickly degraded by *DPYD* [20]. Ciccolini *et al.* estimate that 60–70% of the severe toxicity induced by 5-FU/capecitabine can be attributed to alterations in *DPYD* activity [21]. Several DNA variations in *DPYD* can affect mRNA expression or protein functionality, leading to a syndrome called *DPYD* deficiency [22]. These polymorphisms have also been related to 5-FU-induced toxicity (TABLE 1) [23]. The most frequent and studied variation of *DPYD* is a splice-variation in intron 14 (intronic variant sequence [IVS]14+1 G>A, rs3918290) that produces a nonfunctional protein. The role of *DPYD* in 5-FU-induced toxicity was well reviewed recently by Amstutz *et al.* [24]. However, although *DPYD* polymorphisms are related to fluoropyrimidine toxicity in most studies, the results are not conclusive, probably because a limited number of *DPYD* polymorphisms are analyzed and there are more than 18 DNA variations that affect protein activity [25,205]. The simultaneous presence of variants *DPYD*\*2A and 2846A>T was shown to be lethal in several cases shortly after initiation of treatment with fluoropyrimidine [26,27]. Deenen *et al.* found that 100% of patients carrying the IVS14+1 polymorphism developed severe toxicity [28]. Measuring *DPYD* activity has been suggested to be a better biomarker for fluoropyrimidine-induced toxicity than *DPYD* genotyping, although recent findings confirm that genotyping and haplotyping could be acceptable options for stratifying patients

**Box 1. Very common adverse reactions to drugs used in colorectal cancer<sup>a</sup>.****5-Fluorouracil**

- Electrocardiogram changes
- Myelosuppression, neutropenia, thrombocytopenia, leukopenia, agranulocytosis, anemia and pancytopenia
- Mucositis, anorexia, diarrhea, nausea and vomiting
- Alopecia
- Hyperuricemia
- Delayed healing, epistaxis and fatigue
- Bronchospasm
- Immunosuppression

**Capecitabine**

- Anorexia
- Diarrhea, nausea and vomiting, stomatitis and abdominal pain
- Hand-foot syndrome
- Fatigue and asthenia

**Oxaliplatin (FOLFOX)**

- Infection
- Anemia, neutropenia, thrombocytopenia, leukopenia and lymphopenia
- Allergy/allergic reaction
- Anorexia, blood glucose and natremia abnormalities and hypokalemia
- Peripheral sensory neuropathy, sensory disturbance, dysgeusia and headache
- Epistaxis
- Dyspnea and cough
- Nausea and vomiting, diarrhea, stomatitis/mucositis, abdominal pain and constipation
- Skin disorder and alopecia
- Back pain
- Fatigue, fever, asthenia, pain and injection-site reaction
- Increased hepatic enzymes, increased blood alkaline phosphatase, increased blood bilirubin, increased blood lactate dehydrogenase and increased weight (adjuvant setting)

**Irinotecan**

- Diarrhea
- Nausea and vomiting
- Neutropenia and anemia
- Alopecia

<sup>a</sup>Very common (frequency of  $\geq 1/10$ ) adverse reactions.

FOLFOX: 5-fluorouracil, folinic acid modulation and oxaliplatin.

according to risk of toxicity [28,29] or establishing dose recommendations for 5-FU, capecitabine and tegafur, as shown by the Pharmacogenetics Working Group of the Royal Dutch Pharmacists Association [30].

The authors highly recommend genotyping for *DPYD\*2A* before prescribing 5-FU, capecitabine or tegafur to identify patients with a very high probability of developing severe ADRs at conventional doses.

### ■ TYMS

TYMS catalyzes the methylation of deoxyuracilmonophosphate, one of the three active metabolites of 5-FU, to deoxythymine monophosphate. It is an important target for 5-FU

in CRC patients. The three principal polymorphisms in *TYMS* are a deletion of 6 bp in 3'-UTR (rs34489327), a repeat of 28 bp in the promoter region and a G>C SNP within this repeat (rs34743033). These polymorphisms have been associated with *TYMS* expression, and overexpression of *TYMS* has been linked to drug resistance and lower survival in patients with metastatic (m)CRC [31]. Most pharmacogenetics studies on *TYMS* genomic variants and treatment with 5-FU focus on efficacy [32]. However, some attempt to correlate *TYMS* genotypes with ADRs to 5-FU-based treatments (TABLE 2), mostly with negative results [1,3–5,33–35], although a few have shown positive correlations in advanced gastric cancer [36] and in CRC [37].



Table 1. Association of *DPYD* polymorphisms with toxicity in colorectal cancer patients.

Author (year)	SNP ID (other names)	Cancer type (patients, n)	Treatment	Adverse reaction studied and toxicity grade	Effect on toxicity	Ref.
McLeod et al. (2010)	rs3918290 ( <i>DPYD</i> *2A, IVS14+1G>A, 1905+1G>A)	mCRC (520)	FOLFOX, FOLFIRI, IROX	Diarrhea, neutropenia, vomiting, neuropathy, febrile neutropenia Toxicity $\geq 3$ for all ADRs except for neutropenia ( $\geq 4$ ) CTCAE v2.0	No toxicity	[4]
Etienne-Grimaldi et al. (2010)		mCRC (117)	FOLFOX-7	Neutropenia, thrombocytopenia, anemia, nausea/vomiting, mucositis, diarrhea, hand-foot syndrome, neurotoxicity and alopecia Toxicity $\geq 3$	No toxicity	[33]
Deenen et al. (2011)		mCRC (568)	XELOX-bevacizumab	Diarrhea, dehydration, nausea/vomiting, stomatitis, hand-foot syndrome, leukopenia and febrile neutropenia Toxicity, at least one ADR $\geq 4$ or at least two ADRs $\geq 3$	71 % with one allele *2A developed diarrhea $\geq 3$ 100% of <i>DPYD</i> *2A carriers developed at least one toxicity $\geq 3$	[28]
Kristensen et al. (2010)		CRC (68)	5-FU-based regimen	Thrombocytopenia, diarrhea, nausea/vomiting, neurotoxicity, cardiac toxicity, alopecia and hand-foot syndrome Toxicity $\geq 1$ according to CTCAE v3.0	Carriers of mutation have a relative risk of toxicity of 2	[37]
Tsunoda et al. (2011)		CRC (99) stage II or III	Uracil-tegafur + leucovorin	Hematological toxicity (leukopenia, anemia and thrombocytopenia), stomatitis, anorexia, nausea, vomiting, diarrhea, rash, pigmentation, fatigue, taste disorder, smell disorder, muscle pain, hyperbilirubinemia, AST, ALT and creatinine Toxicity $\geq 3$	No toxicity	[1]
Capitain et al. (2008)		mCRC (76)	5-FU	Mucositis, conjunctivitis, diarrhea, hand-foot syndrome, cardiac toxicity, hematological toxicity nausea, alopecia and asthenia Toxicity $\geq 3$ Multivariate analysis used	Increased toxicity in carriers of <i>DPYD</i> *2	[40]
McLeod et al. (2010)	rs1801159 ( <i>DPYD</i> *5, 1627A>G)	mCRC (520)	FOLFOX, FOLFIRI, IROX	Diarrhea, neutropenia, vomiting, neuropathy, febrile neutropenia Toxicity $\geq 4$	No toxicity	[4]
Tsunoda et al. (2011)		CRC (99) stage II or III	Uracil-tegafur + leucovorin	Hematological toxicity (leukopenia, anemia and thrombocytopenia), stomatitis, anorexia, nausea, vomiting, diarrhea, rash, pigmentation, fatigue, taste disorder, smell disorder, muscle pain, hyperbilirubinemia, AST, ALT and creatinine Toxicity $\geq 3$	No toxicity	[1]
Afzal et al. (2011)		CRC (161 + 340)	5-FU-based adjuvant	Toxicity with CTCAE and WHO criteria Diarrhea, nausea/vomiting and stomatitis/pharyngitis Toxicity $\geq 3$	No toxicity	[38]

The Common Terminology Criteria for Adverse Events can be found at [20] and the WHO criteria can be found at [20].  
 5-FU: 5-fluorouracil; ADR: Adverse drug reaction; CRC: Colorectal cancer; mCRC: Metastatic colorectal cancer; CTCAE: Common Terminology Criteria for Adverse Events; FOLFIRI: 5-fluorouracil, folinic acid modulation and irinotecan; FOLFOX: 5-fluorouracil, folinic acid modulation and oxaliplatin; IROX: Irinotecan and oxaliplatin; XELOX: Capecitabine and oxaliplatin.

Table 1. Association of DPYD polymorphisms with toxicity in colorectal cancer patients (cont.).

Author (year)	SNP ID (other names)	Cancer type (patients, n)	Treatment	Adverse reaction studied and toxicity grade	Effect on toxicity	Ref.
Deenen et al. (2011)	rs2846A>T (DPYD*9A, 85T>C)	mCRC (568)	XELOX-bevacizumab	Diarrhea, dehydration, nausea/vomiting, stomatitis, hand-foot syndrome, leukopenia and febrile neutropenia Toxicity, at least one ADR $\geq 4$ , or at least two ADRs $\geq 3$	63% of patients with this SNP had toxicity $\geq 3$	[28]
Capitain et al. (2008)		mCRC (76)	5-FU	Mucositis, conjunctivitis, diarrhea, hand-foot syndrome, cardiac toxicity, hematological toxicity, nausea, alopecia and asthenia Toxicity $\geq 3$ Multivariate analysis used	No toxicity	[40]
Tsunoda et al. (2011)	rs1801265 (DPYD*9A, 85T>C)	CRC (99) stage II or III	Uracil-tegafur + leucovorin	Hematological toxicity (leukopenia, anemia, thrombocytopenia), stomatitis, anorexia, nausea, vomiting, diarrhea, rash, pigmentation, fatigue, taste disorder, smell disorder, muscle pain, hyperbilirubinemia, AST, ALT and creatinine Grade 2 or higher Toxicity $\geq 3$	No toxicity	[1]
Afzal et al. (2011)		CRC (161+340)	5-FU-based adjuvant	Toxicity with CTCAE and WHO criteria Diarrhea, nausea/vomiting and stomatitis/pharyngitis Toxicity $\geq 3$	No toxicity	[38]
Deenen et al. (2011)	rs1236G>A	mCRC (568)	XELOX-bevacizumab	Diarrhea, dehydration, nausea/vomiting, stomatitis, hand-foot syndrome, leukopenia and febrile neutropenia Toxicity, at least one ADR $\geq 4$ or at least two ADRs $\geq 3$	50% of carriers of this SNP had toxicity $\geq 3$	[28]
Kristensen et al. (2010)	rs17376848 (1896C>T)	CRC (68)	5-FU-based regimen	Thrombocytopenia, diarrhea, nausea/vomiting, neurotoxicity, cardiac toxicity, alopecia and hand-foot syndrome Toxicity $\geq 1$ according to CTCAE v3.0	Carriers of mutation have a relative risk of toxicity of 6	[37]
Tsunoda et al. (2011)	rs1801160 (DPYD*6, 2194G>A)	CRC (99) stage II or III	Uracil-tegafur + leucovorin	Hematological toxicity (leukopenia, anemia and thrombocytopenia), stomatitis, anorexia, nausea, vomiting, diarrhea, rash, pigmentation, fatigue, taste disorder, smell disorder, muscle pain, hyperbilirubinemia, AST, ALT and creatinine Toxicity $\geq 3$ Univariate and multivariate analysis used	No toxicity	[1]
Afzal et al. (2011)	rs2297595 (496A>G)	CRC (161 + 340)	5-FU-based adjuvant	Toxicity with CTCAE and WHO criteria Diarrhea, nausea/vomiting and stomatitis/pharyngitis Toxicity $\geq 3$	No toxicity	[38]

The Common Terminology Criteria for Adverse Events can be found at [20] and the WHO criteria can be found at [20].  
5-FU: 5-fluorouracil; ADR: Adverse drug reaction; CRC: Colorectal cancer; mCRC: Metastatic colorectal cancer; CTCAE: Common Terminology Criteria for Adverse Events; FOLFIRI: 5-fluorouracil, folinic acid modulation and irinotecan; FOLFOX: 5-fluorouracil, folinic acid modulation and oxaliplatin; IROX: Irinotecan and oxaliplatin; XELOX: Capecitabine and oxaliplatin.

Table 2. Association of *TYMS* polymorphisms with toxicity in colorectal cancer patients.

Author (year)	Cancer type (patients, n)	Treatment	ADRs studied and toxicity grade	Effects on toxicity		Ref.
				TYMS 6 deletion (rs34489327)	TYMS 28 bp repeat in promoter region	
Boige <i>et al.</i> (2010)	mCRC (349)	5-FU/LV + FOLFOX + FOLFIRI or FOLFOX + FOLFIRI	Hematological, GI and neurological toxicity according to CTCAE v2.0	No toxicity	No toxicity	[3]
McLeod <i>et al.</i> (2010)	mCRC (520)	FOLFOX or FOLFIRI or IROX	Diarrhea, neutropenia, vomiting, neuropathy and febrile neutropenia Toxicity $\geq 3$ for all ADRs except for neutropenia $\geq 4$	No toxicity	No toxicity	[4]
Etienne-Grimaldi <i>et al.</i> (2010)	mCRC (117)	FOLFOX-7	Neutropenia, thrombocytopenia, anemia, nausea/vomiting, mucositis, diarrhea, hand-foot syndrome, neurotoxicity and alopecia Toxicity $\geq 3$	No toxicity	No toxicity	[33]
Ruzzo <i>et al.</i> (2007)	mCRC (166)	FOLFOX-4	Toxicity according to CTCAE except for neurotoxicity Anemia, leukopenia, thrombocytopenia, nausea/vomiting, mucositis and asthenia Different grades considered	No toxicity	No toxicity	[34]
Kristensen <i>et al.</i> (2010)	CRC (68)	5-FU-based regimen	Thrombopenia, diarrhea, nausea/vomiting, neurotoxicity, cardiac toxicity, alopecia and hand-foot syndrome Toxicity $\geq 1$ according to CTCAE v3.0	No toxicity	Two repeats/two repeats higher toxicity risk	[37]
Braun <i>et al.</i> (2009)	mCRC (688)	5-FU, FOLFOX, FOLFIRI, irinotecan alone and irinotecan containing	Dose reduction and/or delay, any CTCAE toxicity $\geq 3$ or after two delays for grade 2 toxicity	No dose reduction or delay No toxicity	No dose reduction or delay No toxicity	[5]
Tsunoda <i>et al.</i> (2011)	CRC (99)	Tegafur-LV	Hematological toxicity (leukopenia, anemia and thrombocytopenia), stomatitis, anorexia, nausea, vomiting, diarrhea, rash, pigmentation, fatigue, taste disorder, smell disorder, muscle pain, hyperbilirubinemia, AST, ALT and creatinine Toxicity $\geq 3$	No toxicity	–	[1]
Thomas <i>et al.</i> (2011)	CRC (131)	5-FU + RT or 5-FU + RT + irinotecan	Toxicity $\geq 3$ according to CTCAE v2.0	No toxicity	No toxicity	[35]
Afzal <i>et al.</i> (2011)	CRC (161+340)	5-FU-based adjuvant	Toxicity with CTCAE and WHO criteria Diarrhea, nausea/vomiting and stomatitis/pharyngitis Toxicity $\geq 3$	Association with GI toxicity together with <i>MTHFR</i> 1298A>C	No toxicity	[38]

The Common Terminology Criteria for Adverse Events can be found at [20] and the WHO criteria can be found at [20].  
 5-FU: 5-fluorouracil; ADR: Adverse drug reaction; CRC: Colorectal cancer; CTCAE: Common Terminology Criteria for Adverse Events; FOLFIRI: 5-fluorouracil, folinic acid modulation and irinotecan; FOLFOX: 5-fluorouracil, folinic acid modulation and oxaliplatin; GI: Gastrointestinal; IROX: Irinotecan and oxaliplatin; LV: Leucovorin; mCRC: Metastatic colorectal cancer; RT: Radiotherapy.

Recently, Afzal *et al.* demonstrated results indicating that a specific combination of the *TYMS* 3'-UTR insertion/deletion, and *MTHFR* 1298A>C polymorphisms and *MTHFR* activity are possible predictors of 5-FU treatment-related toxicity, indicating that a multigenic approach is probably necessary [38]. No statistical association with toxicity was found when these and other SNPs were analyzed individually. This means that a combination of genotypes could be more useful than individual genotypes for predicting ADRs, although a higher population than usual would be necessary to validate these biomarkers.

#### ■ MTHFR

The protein *MTHFR* participates in the reduction of 5,10-methylenetetrahydrofolate, which is the substrate for *de novo* purine synthesis. Two widely studied missense polymorphisms diminish the activity of the *MTHFR* gene, namely 1298A>C (rs1801131) and 677C>T (rs1801133) [39]. As for the pharmacogenetics of ADRs, the results for *MTHFR* polymorphisms are controversial (TABLE 3). Capitain *et al.* found that 1298A>C but not 677C>T was associated with increased toxicity in patients with metastatic CRC (mCRC) treated with 5-FU/leucovorin [40]. Tsunoda *et al.* showed that AA carriers with the 1298A>C suffered less fatigue than AC carriers, although no association with the 677C>T SNP was observed [1]. In this sense, Sharma *et al.* found that patients with the AA genotype for 1298A>C experienced fewer grade 2 or higher ADRs when treated with capecitabine [41]. By contrast, other studies have found that the 677C>T SNP but not 1298A>C are associated with grade 3–4 toxicity and diarrhea [42–45]. However, while Glimelius *et al.* found that the 677C>T CC genotype was associated with higher rates of toxicity [44], other authors found that CC genotypes correlated with less toxicity [42]. Furthermore, several studies have been unable to show an association between any of these polymorphisms and toxicity [3,4,33,34,36]. As described above in the section on *TYMS*, *MTHFR* activity and a specific combination of the *TYMS* 3'-UTR insertion/deletion and *MTHFR* 1298A>C polymorphisms are possible predictors of 5-FU-related toxicity [38]. Given these results, pharmacogenetics cannot be recommended to predict toxicity associated with *MTHFR* polymorphisms.

#### ■ Other genes

The enzyme CDA participates in the conversion of capecitabine to 5-FU. Two nonsynonymous SNPs in the *CDA* gene – rs2072671 (79A>C)

and rs60369023 (208G>A) – were shown to reduce CDA enzyme activity and correlate with toxicity in gemcitabine-treated patients [46,47]. As for capecitabine toxicity and *CDA*, a further two SNPs – rs3215400 (-31delC) and rs532545 (-451C>T) – have been shown to be related to toxicity. Capecitabine-treated CRC or breast cancer patients with two -31delC alleles presented a higher incidence of grade 3 hand-foot syndrome than patients with CC or Cdel. In addition, the -4541T allele was associated with grade 3 hand-foot syndrome [48].

As mentioned above, the *ABCB1* SNP C1236T has been associated with neutropenia in capecitabine-based chemotherapy, but not in 5-FU-based chemotherapy, thus revealing for the first time a differential biomarker for these two treatments [2].

Tegafur is converted to 5-FU, and the principal enzyme responsible for this conversion is *CYP2A6*. A number of *CYP2A6* polymorphisms have been associated with variations in enzyme activity [49,50], but no differences in toxicity pattern have been observed between patients with different *CYP2A6* genotypes [1,51].

### Pharmacogenetics of ADRs induced by oxaliplatin

#### ■ GSTs

GSTs are enzymes responsible for detoxification of some drugs and potential carcinogens through glutathione conjugation [52]. GSTs are encoded by at least five related gene families:  $\alpha$  (*GSTA1*),  $\mu$  (*GSTM1*),  $\pi$  (*GSTP1*),  $\sigma$  (*GSTS1*) and  $\theta$  (*GSTT1*).

Two major polymorphisms in *GSTP1* – rs1695 (Ile105Val or A105G) and rs1138272 (Ala114Val) – induce amino acid changes in the electrophile-binding active site of the enzyme [53].

Several studies point to a higher risk of toxicity in mCRC patients with Ile105Val (TABLE 4) [4,34,54]. McLeod *et al.* found that patients who were homozygous for this variant were more likely to discontinue treatment with FOLFOX due to development of neurotoxicity [4]. However, discontinuation was not necessary when patients were treated with other oxaliplatin-containing regimens (capecitabine and oxaliplatin or irinotecan and oxaliplatin [IROX]). Homozygous carriers of the variant allele G were prone to grade 3 neurotoxicity than heterozygous or A homozygous carriers, probably owing to a decrease in the catabolic activity of the enzyme and consequential detoxification to oxaliplatin [34,54]. However, other studies found no association between this SNP and toxicity

Table 3. Association of *MTHFR* polymorphisms with toxicity in colorectal cancer patients.

Author (year)	Cancer type (patients, n)	Treatment	ADRs studied and toxicity grade	MTHFR 677C>T	Effect on toxicity	Ref.
Boige <i>et al.</i> (2010)	mCRC (349)	5-FU/LV + FOLFOX + FOLFIRI + FOLFOX + FOLFIRI	Hematological, gastrointestinal and neural toxicity according to CTCAE v2.0	No toxicity	MTHFR 1298A>C No toxicity	[3]
Chua <i>et al.</i> (2009)	mCRC (118)	FOLFOX	Hematological, gastrointestinal and neurologic toxicity $\geq 3$	TT increased risk of grade $\geq 3$ diarrhea than CT or CC		[43]
McLeod <i>et al.</i> (2010)	mCRC (520)	FOLFOX, XELOX, IROX	Diarrhea, neutropenia, vomiting, neuropathy and febrile neutropenia Toxicity $\geq 3$ for all ADRs except for neutropenia $\geq 4$ CTCAE v2.0	No toxicity	No toxicity	[4]
Etienne-Grimaldi <i>et al.</i> (2010)	mCRC (117)	FOLFOX-7	Neutropenia, thrombocytopenia, anemia, nausea/vomiting, mucositis, diarrhea, hand-foot syndrome, neurotoxicity and alopecia Toxicity $\geq 3$	No toxicity	No toxicity	[33]
Ruzzo <i>et al.</i> (2007)	mCRC (166)	FOLFOX-4 (first line)	Anemia, leukopenia, thrombocytopenia, nausea/vomiting, diarrhea, mucositis, asthenia and neurologic toxicity Toxicity $\geq 3$	No toxicity	No toxicity	[34]
Kristensen <i>et al.</i> (2010)	CRC (68)	5-FU-based regimen	Neutropenia, thrombopenia, diarrhea, cardiac toxicity, alopecia and hand-foot syndrome CTCAE v3.0 Toxicity $\geq 3$	CT increased risk of early toxicity but not TT	CC increased risk of early toxicity	[37]
Braun <i>et al.</i> (2009)	mCRC (688)	5-FU, FOLFOX, FOLFIRI, irinotecan	Hematologic and nonhematologic toxicity Dose delay and/or reduction or any ADR grade $\geq 3$ CTCAE v2.0	No toxicity		[5]
Glimelius <i>et al.</i> (2011)	CRC (140)	FOLFIRI	Toxicity $\geq 3$ according to CTCAE dose delay, dose reduction or discontinuation after the first two cycles	CT patients present lower risk of toxicity after two cycles of chemotherapy	No toxicity	[44]

The Common Terminology Criteria for Adverse Events can be found at [20].  
 5-FU: 5-fluorouracil; ADR: Adverse drug reaction; CRC: Colorectal cancer; CTCAE: Common Terminology Criteria for Adverse Events; FOLFIRI: 5-fluorouracil, folinic acid modulation and irinotecan; FOLFOX: 5-fluorouracil, folinic acid modulation and oxaliplatin; GI: Gastrointestinal; IROX: Irinotecan and oxaliplatin; LV: Leucovorin; mCRC: Metastatic colorectal cancer; RT: Radiotherapy; XELOX: Capecitabine and oxaliplatin.



Table 3. Association of *MTHFR* polymorphisms with toxicity in colorectal cancer patients (cont.).

Author (year)	Cancer type (patients, n)	Treatment	ADRs studied and toxicity grade	MTHFR 677C>T	Effect on toxicity	Ref.
Tsunoda et al. (2011)	CRC (99)	Uracil-tegafur/LV	Hematological toxicity (leukopenia, anemia and thrombocytopenia), stomatitis, anorexia, nausea, vomiting, diarrhea, rash, pigmentation, fatigue, taste disorder, smell disorder, muscle pain, hyperbilirubinemia, AST, ALT and creatinine Toxicity $\geq 3$ or $\geq 2$	No toxicity	MTHFR 1298A>C Higher risk of fatigue $\geq 2$ in AC genotypes than AA	[1]
Thomas et al. (2011)	CRC (131)	5-FU + RT or 5-FU + RT + Irinotecan	Diarrhea and mucositis Toxicity $\geq 3$ or $\geq 2$ according to CTCAE v2.0	Decreased risk of toxicity for the haplotype 677C-1298C in 5-FU + RT-treated patients	Higher risk of diarrhea and mucositis in AA homozygotes treated with 5-FU/RT Decreased risk of toxicity for the haplotype 677C-1298C in 5-FU + RT-treated patients	[35]
Afzal et al. (2011)	CRC (exploration cohort: 161 and validation cohort: 340; total: 501)	5-FU-based adjuvant	Toxicity with CTCAE and WHO criteria Diarrhea, nausea/vomiting and stomatitis/pharyngitis Toxicity $\geq 3$	No toxicity	No toxicity alone Relation with GI toxicity together with TYMS insertion/deletion	[38]
Tafin et al. (2011)	CRC (150)	5-FU-based adjuvant	Diarrhea, fatigue, nausea, leukopenia, paresthesia and dose reduction No information about grade or criteria	Patients with CC genotype carried lower risk of suffering from nausea, paresthesia and need for dose reduction Patients with MTR AG/GG in combination with MTHFR 677CT/TT carried the highest number of ADRs	–	[45]
Capitain et al. (2008)	mCRC (76)	5-FU	Mucositis, conjunctivitis, diarrhea, hand-foot syndrome, cardiac, hematologic, nausea, alopecia and asthenia Toxicity $\geq 3$ Multivariate analysis used	No toxicity	CC genotypes present higher rates of toxicity	[40]
Sharma et al. (2008)	mCRC (57)	Capecitabine	Fatigue, hand-foot syndrome, stomatitis, diarrhea, nausea/vomiting, anemia and liver toxicity CTCAE v2.0 Toxicity $\geq 2$	TT less toxicity than CT or CC CT and TT less fatigue than CC CC less hand-foot syndrome than CT and TT	AA suffered less toxicity in general and fatigue in particular than AC and CC	[41]

The Common Terminology Criteria for Adverse Events can be found at [20] and the WHO criteria can be found at [20].  
5-FU: 5-fluorouracil; ADR: Adverse drug reaction; CRC: Colorectal cancer; CTCAE: Common Terminology Criteria for Adverse Events; FOLFIRI: 5-fluorouracil, folinic acid modulation and irinotecan; FOLFOX: 5-fluorouracil, folinic acid modulation and oxaliplatin; GI: Gastrointestinal; IRQX: Irinotecan and oxaliplatin; LV: Leucovorin; mCRC: Metastatic colorectal cancer; RT: Radiotherapy; XELOX: Capecitabine and oxaliplatin.

[3,5,33,55–57]. In gastrointestinal cancer patients treated with platin-based therapy, those homozygous for the *GSTP1* 105Ile allele had a higher risk of grade 3/4 neutropenia and grade 3 neurotoxicity than those who were homozygous or heterozygous for the *GSTP1* 105Val allele [36,58]. Furthermore, Inada *et al.* found that CRC patients with the wild-type genotype were more likely to develop early oxaliplatin-induced grade 1 peripheral neurotoxicity than patients with the variant allele, although no association with grade  $\geq 2$  neurotoxicity was established [59].

*GSTP1* is not known to play a role in the metabolic pathway of either 5-FU or irinotecan. However, Braun *et al.* found an association between the variant allele in rs1695 and grade  $\geq 3$  toxicity in 270 patients with mCRC who were being treated with first- or second-line FOLFIRI [5]. In patients with mid–low rectal cancer treated with 5-FU-based preoperative chemoradiotherapy, carrying the Val/Val genotype implied a lower risk of hematological toxicity than the Ile/Ile genotype [60].

No association has been established between rs1138272 (Ala114Val) and the development of toxicity [33,58].

Copy number variations of *GSTT1* and their association with toxicity to oxaliplatin have been studied. Goekkurt *et al.* found no statistically significant association between this copy number variation and the development of toxicity in patients with gastric cancer, although there was a trend showing that patients with the null variant were less likely to develop hematologic toxicity [36]. Other studies did not find any statistically significant association between this polymorphism and toxicity in patients with mCRC receiving an oxaliplatin-containing regimen [3,33].

Deletion of the *GSTM1* gene has been significantly associated with grade 4 neutropenia in advanced CRC patients receiving FOLFOX [4]. However, no association was demonstrated in a smaller sample (117 vs 299) with similar treatment [33] or in gastrointestinal cancer patients receiving a platinum-based regimen [36].

#### ■ Excision repair cross-complementation genes

Excision repair cross-complementation (ERCC) proteins are involved in nucleotide repair systems. Polymorphisms in genes coding for these repair proteins could contribute to interindividual differences in toxicity to oxaliplatin.

The association between toxicity and rs11615 in *ERCC1* (C354T, Asn118Asn) has been

studied in CRC. Inada *et al.* associated the mutant allele T of this SNP with early grade 1 neuropathy in CRC patients receiving an oxaliplatin-based regimen, although no association was found with higher grades of neuropathy [59]. By contrast, Boige *et al.* found that CC carriers were more likely to develop hematologic toxicity, but this difference was not statistically significant [3]. Many other studies were unable to find an association with toxicity [4,33,34,43,61].

Goekkurt *et al.* found that the haplotype ERCC1 -118T/8092C was related to the appearance of grade 3/4 neutropenia in gastric cancer patients [36].

*ERCC2*, otherwise known as *XPD*, is also involved in the oxaliplatin pathway. Five polymorphisms in this gene have been studied in order to investigate associations with toxicity. These are rs1799793 (C312T or Asp312Asn), rs13181 (A751C, Lys751Asn or K751Q), C2133T, A1989G and A2251G.

Boige *et al.* found that patients who were homozygous for the variant allele in rs13181 (*ERCC2* Lys751Gln or A751C) were more likely to develop hematologic toxicity [3]. However, other authors failed to find this or other associations between *ERCC2* genotypes and toxicity to oxaliplatin in CRC patients [4,5,33,34,62]. In gastrointestinal cancer patients treated with oxaliplatin- or cisplatin-based chemotherapy, statistically significant associations were found between the presence of the homozygous variant genotype of rs1799793 (C312T or Asp312Asn) and the homozygous variant genotype of rs13181 and the development of grade 3/4 neutropenia, leukopenia and nephrotoxicity [36]. Furthermore, an *ERCC2* haplotype consisting of both variants was identified as an independent risk factor for the appearance of nephrotoxicity. Both rs1799793 and rs13181 have been associated with suboptimal DNA repair capacity [63]. Other polymorphisms of the *ERCC2* gene (C2133T, A1989G and A2251G) were not associated with development of toxicity in FOLFOX, FOLFIRI or IROX [4].

#### ■ X-ray cross-complementing genes

X-ray cross-complementing proteins are also involved in DNA repair systems. No association has been demonstrated between polymorphisms of *XRCC1* gene and toxicity in oxaliplatin-treated CRC patients [4,5,33,34,43] or in gastric cancer patients [36]. However, Wang *et al.* concluded that lung cancer patients carrying at least one variant *XRCC1* Arg399Gln allele had an increased risk of grade 3/4

gastrointestinal toxicity when treated with first-line cisplatin-based chemotherapy [64].

The polymorphism Thr241Met in the *XRCC3* gene was not associated with toxicity in mCRC patients treated with first-line FOLFOX chemotherapy [34].

### Pharmacogenetics of ADRs induced by irinotecan

#### ■ Uridine-diphospho-glucuronosyltransferase genes

SN-38, the active metabolite of irinotecan, is metabolized via the action of several uridine-diphospho-glucuronosyltransferases, including hepatic UGT1A1, UGT1A6 and UGT1A9, and extrahepatic UGT1A7 [65–68].

UGT1A1 is the principal enzyme participating in SN-38 metabolism, and its activity is related to the number of dinucleotide thymine–adenine (TA) repeats in the promoter region of the gene. The variant allele *UGT1A1*\*28, with seven TA repeats, has been associated with reduced levels of the enzyme and increased levels of SN-38 in comparison with the wild-type *UGT1A1*\*1, which has six TA repeats. Numerous studies have shown that patients carrying the \*28 allele more frequently experience hematological toxicity and diarrhea (SUPPLEMENTARY TABLE 1, see [www.futuremedicine.com/doi/suppl/10.2217/pgs.12.95](http://www.futuremedicine.com/doi/suppl/10.2217/pgs.12.95)) [44,69–80]. A diagnostic kit to test for this polymorphism was approved 1 year after the FDA warning in 2004 to start patients who were homozygous for the *UGT1A1*\*28 allele at a lower dose of irinotecan.

In the study by Innocenti *et al.* in 66 advanced CRC patients receiving irinotecan, the relative risk of grade 4 neutropenia was 9.3 for those patients carrying \*28/\*28 [74]. However, the external validity of this study remains controversial, mainly because a dose of 350 mg/m<sup>2</sup> of irinotecan was administered instead of the 180 mg/m<sup>2</sup> normally used in the FOLFIRI regimens. This limitation was solved by Toffoli *et al.* who, in a larger sample of 250 mCRC patients, demonstrated that the *UGT1A1*\*28 polymorphism was related to a higher risk of grade 3/4 hematologic toxicity during the first cycle of FOLFIRI [81]. These results are consistent with those recently published by McLeod *et al.*, who demonstrated that homozygous \*28/\*28 carriers receiving 200 mg/m<sup>2</sup> irinotecan as a part of an IROX regimen more frequently developed grade 4 neutropenia [4].

A meta-analysis by Hoskins *et al.* concluded that the risk of hematological toxicity for homozygous *UGT1A1*\*28/\*28 carriers was

dose dependent when irinotecan was administered at high doses (>250 mg/m<sup>2</sup>) and medium doses (150–250 mg/m<sup>2</sup>), but not at low doses (<150 mg/m<sup>2</sup>) [82]. This observation was confirmed by the results of a study that found no association between toxicity and a regimen containing low-dose irinotecan (80 mg/m<sup>2</sup>) [83]. By contrast, a recent clinical trial in the UK using doses of 180 mg/m<sup>2</sup> of irinotecan failed to show any correlation between *UGT1A1*\*28 and toxicity [5]. Furthermore, the study by Boige *et al.* did not reveal a statistically significant association, even if more hematological toxicity was observed in *UGT1A1*\*28/\*28 carriers receiving FOLFIRI (180 mg/m<sup>2</sup> irinotecan) [3].

The irinotecan drug label recommends decreasing the dose in homozygous *UGT1A1*\*28 allele carriers to prevent undesired adverse reactions [203]. Investigating the maximum tolerated dose in patients with the *UGT1A1*\*28/\*28 genotype, Marcuello *et al.* found that a 30% decrease in the standard dose of irinotecan was the maximum tolerated dose [84]. Surprisingly, the most relevant finding from this study was that the standard dose of irinotecan in the FOLFIRI regimen is considerably lower than the dose that can be tolerated by patients with the *UGT1A1*\*1/\*1 and \*1/\*28 genotypes. This is an interesting example of how pharmacogenetics can help to improve currently used treatments without increasing the likelihood of ADRs. Genotyping for *UGT1A1*\*28 should be performed before irinotecan administration at doses higher than 180 mg/m<sup>2</sup> to avoid adverse severe reactions.

This variant is predictive of developing severe neutropenia after administration of irinotecan. Prediction of severe neutropenia by -3156G>A genotyping was comparable with that obtained by *UGT1A1*\*28 in the study by Innocenti *et al.* in 2004 [74], and shown to be even better in two other studies [77,85]. By contrast, some studies [3,4] have failed to find a significant association between the polymorphism -3156G>A and severe irinotecan-associated toxicity, although the genotype AA tended to be associated with increased hematologic toxicity in the study by Boige *et al.* [3]. Regarding gastrointestinal toxicity, there is evidence that individuals carrying two copies of -3156G>A have a significantly increased risk of diarrhea throughout treatment [86].

Another SNP studied is *UGT1A1* -3279T>G (rs4124874), which has not been shown to be associated with grade 3/4 toxicity, dose delay, dose reduction or discontinuation of a FOLFIRI regimen [44].



Table 4. Association of polymorphisms in *GST* genes with toxicity in colorectal cancer patients.

Author (year)	Cancer type (patients, n)	Treatment	ADRs studied and toxicity grade	Effect on toxicity				Ref.
				GSTP1 rs1695 (Ile105Val)	GSTP1 2293C>T	GSTP1 (Ala114Val) rs1138272	GSTT1 CNV	
Boige et al. (2010)	mCRC (349)	5-FU/LV + FOLFOX + FOLFIRI + FOLFOX + FOLFIRI	Hematologic, GI and neurologic toxicity $\geq 3$ according to CTCAE v2.0 Toxicity $\geq 3$ , except for neuropathy $\geq 2$	No toxicity	–	–	No toxicity	[3]
McLeod et al. (2010)	mCRC (520)	FOLFOX or FOLFIRI or IROX	Diarrhea, neutropenia, vomiting, neuropathy and febrile neutropenia Toxicity $\geq 3$ for all ADR except for neutropenia $\geq 4$	Increased probability to stop FOLFOX treatment by neurotoxicity in Val/Val patients	No toxicity	–	–	[4]
Etienne-Grimaldi et al. (2010)	mCRC (117)	FOLFOX-7	Neutropenia, thrombocytopenia, anemia, nausea/vomiting, mucositis, diarrhea, hand-foot syndrome, neurotoxicity and alopecia Toxicity $\geq 3$	No toxicity	–	No toxicity	No toxicity	[33]
Ruzzo et al. (2007)	mCRC (166)	FOLFOX-4 first line	Toxicity according to CTCAE except neurotoxicity Anemia, leukopenia, thrombocytopenia, nausea/vomiting, mucositis and asthenia Different grades considered	Val/Val higher risk of neurotoxicity $\geq 3$ than Ile/Val and Ile/Ile	–	–	–	[34]
Braun et al. (2009)	mCRC (688)	5-FU, FOLFOX, FOLFIRI, irinotecan and irinotecan-containing regimens	Delay and/or dose reduction, any CTCAE toxicity $\geq 3$ or after two delay for grade 2 toxicity	No dose reduction or delay No toxicity	–	–	–	[5]
Chen et al. (2010)	mCRC (166)	FOLFOX first line	Neurotoxicity according to CTCAE Toxicity $\geq 3$	Patients with Val105 allele had a higher incidence of neuropathy	–	–	–	[54]
Agostini et al. (2008)	Mid-low rectal cancer (40)	5-FU-based therapy + RT	Hematological and GI toxicity according to CTCAE toxicity $\geq 1$	Patients Val/Val had a lower risk of hematological toxicity than Ile/Ile	–	–	–	[60]

The Common Terminology Criteria for Adverse Events can be found at [20] and the WHO criteria can be found at [20].  
5-FU: 5-fluorouracil; ADR: Adverse drug reaction; CNV: Copy number variation; CRC: Colorectal cancer; CTCAE: Common Terminology Criteria for Adverse Events; FOLFIRI: 5-fluorouracil, folinic acid modulation and irinotecan; FOLFOX: 5-fluorouracil, folinic acid modulation and oxaliplatin; GI: Gastrointestinal; IROX: Irinotecan and oxaliplatin; LV: Leucovorin; mCRC: Metastatic colorectal cancer; RT: Radiotherapy; XELOX: Capecitabine and oxaliplatin.

Table 4. Association of polymorphisms in GST genes with toxicity in colorectal cancer patients (cont.).

Author (year)	Cancer type (patients, n)	Treatment	ADRs studied and toxicity grade	Effect on toxicity				Ref.
				GSTP1 rs1695 (Ile105Val)	GSTP1 2293C>T	GSTP1 (Ala114Val) rs1138272	GSTT1 CNV	
Paré <i>et al.</i> (2008)	mCRC (126)	FOLFOX	Neurotoxicity, scale reported by Caussanel <i>et al.</i> [101] Toxicity ≥2	No neurotoxicity	–	–	–	[55]
Kivekele <i>et al.</i> (2008)	mCRC (267)	XELIRI/ Capecitabine	Diarrhea, febrile neutropenia and overall toxicity ≥3 according to CTCAE v2.0	No toxicity	–	–	–	[56]
Kivekele <i>et al.</i> (2009)	mCRC (91)	XELOX	Hematological and no hematological toxicities ≥3 according to CTCAE v2.0	No toxicity	–	–	–	[57]
Inada <i>et al.</i> (2010)	CRC (51)	Oxaliplatin based	Neurotoxicity ≥2 and time to appearance of grade ≥1	Neuropathy grade ≥1 developed before in Ile/Ile than Ile/Val or Val/Val patients No association with neuropathy ≥2	–	–	–	[59]
Lecomte <i>et al.</i> (2006)	GI cancer (90)	Oxaliplatin based	Neurotoxicity ≥3, scale reported by Caussanel <i>et al.</i> [101]	Neuropathy grade 3 significantly more frequent in patients homozygous for the GSTP1 105Ile allele than in patients homozygous or heterozygous for the GSTP1 105Val allele	–	–	–	[58]

The Common Terminology Criteria for Adverse Events can be found at [20], and the WHO criteria can be found at [20].  
 5-FU: 5-fluorouracil; ADR: Adverse drug reaction; CNV: Copy number variation; CRC: Colorectal cancer; CTCAE: Common Terminology Criteria for Adverse Events; FOLIRI: 5-fluorouracil, folinic acid modulation and irinotecan; FOLFOX: 5-fluorouracil, folinic acid modulation and oxaliplatin; GI: Gastrointestinal; IROX: Irinotecan and oxaliplatin; LV: Leucovorin; mCRC: Metastatic colorectal cancer; RT: Radiotherapy; XELIRI: Capecitabine and Irinotecan; XELOX: Capecitabine and oxaliplatin.

Two studies carried out within Asian populations showed that the *UGT1A1*\*6 allele (rs4148323) was associated with an increased risk of developing severe grade 4 neutropenia compared with patients harboring the reference genotype. However, these results must be interpreted with caution, since both studies had very small samples [87,88].

#### ■ Other UGTs

Carlini *et al.* found that the low-enzyme-activity *UGT1A7* genotypes *UGT1A7*\*2/\*2 and *UGT1A7*\*3/\*3 were significantly associated with the absence of severe gastrointestinal toxicity [89]. However, Cecchin *et al.* found *UGT1A7*\*3 to be a predictive marker of severe hematologic toxicity after the first cycle of a FOLFIRI regimen [76]. The role of *UGT1A7* in systemic detoxification of SN-38 remains questionable owing to its extrahepatic distribution, mainly in the GI tract; but the effect of the \*3 allele on SN-38 pharmacokinetics has been observed in some studies [90,91]. No association was found between the other three polymorphisms in *UGT1A7* (19T>G, 541A>G and 552A>C) and irinotecan-induced toxicity [89].

*UGT1A9*\*1/\*1 was significantly associated with increased nonhematological toxicity in CRC patients treated with capecitabine and irinotecan, and FOLFIRI [71].

The predictive role of genetic variants in *UGT1A1*, *UGT1A7* and *UGT1A9* and their haplotypes in FOLFIRI-induced toxicity in mCRC patients was recently analyzed by Cecchin *et al.* who showed that the haplotype containing *UGT1A1*\*28, *UGT1A1*\*60, *UGT1A1*\*93 and *UGT1A7*\*3 was a predictor of severe hematologic toxicity [76]. These results stress the importance of analyzing the whole *UGT1A* locus, rather than a single SNP.

#### ATP-binding cassette proteins

Irinotecan and its metabolites are transported out of the cell by ATP-binding cassette proteins. The most studied transporter related to irinotecan is ABCB1 or p-glycoprotein. Three polymorphisms in the *ABCB1* gene – 1236C>T (rs1128503), 2677G>A/T (rs2032582) and 3435C>T (rs1045642) – have been extensively studied and associated with adverse reactions to several drugs [204].

Rhodes *et al.* demonstrated a statistically significant association between grade 3/4 toxicities and the C allele for *ABCB1* 1236C>T in mCRC patients [92]. By contrast, Glimelius *et al.* found no association in 140 CRC patients receiving

5-FU and irinotecan [44]. However, in the same work, the authors found that patients homozygous for *ABCB1* 3435T were at a higher risk of clinically relevant early toxicity. Irinotecan-induced toxicity was not associated with *ABCB1* 2677G>A/T.

Polymorphisms in other transporters, such as *ABCC1* (*ABCC1* IVS11 -48C>T) and *SLCO1B1* (*SLCO1B1*\*1b), have recently been related to neutropenia in mCRC patients treated with high doses of irinotecan (300–350 mg/m<sup>2</sup>) [85]. The polymorphism *ABCG2* 421C>A has also been studied, but no association with irinotecan-induced toxicity has been found [4,88].

The *ABCC2* genotype also seems to be a predictor of the variability of irinotecan pharmacokinetics [85], although no studies have investigated a possible association with irinotecan-induced toxicity.

#### Other genes

*CYP3A4* plays a role in irinotecan oxidation and metabolism, and mutations in this cytochrome might result in decreased metabolism of the drug, but not in increased toxicity [93]. However, incorporation of *CYP3A4* phenotyping, measuring midazolam clearance, in the calculation of the dose of irinotecan has resulted in improved predictability of the toxicity profile of this drug by reducing the incidence of grade 3/4 neutropenia, but not grade 3/4 diarrhea [94].

Finally, polymorphisms in two pharmacodynamic genes, *TOP1* and *TDPI*, have been associated with grade 3/4 neutropenia in mCRC patients receiving an irinotecan-containing regimen [95].

#### Pharmacogenetics of ADRs induced by other drugs

EGFR inhibitors such as the monoclonal antibodies cetuximab and panitumumab are widely used in CRC and improve survival in patients with native *K-ras*. Skin toxicity is one of the most frequent ADRs and results from EGFR expression in the skin [96]. Few studies have tried to associate ADRs with genetic variants in these patients. Skin toxicity seems to be more frequent in CRC patients with a low number of dinucleotide cytosine–adenine repeats in *EGFR* intron 1 [97]. A greater frequency of skin toxicity was also observed in mCRC patients treated with irinotecan and cetuximab, with two alleles containing ≤17 dinucleotide cytosine–adenine repeats [98]. More studies are necessary to validate this association and to find new genetic associations with skin toxicity in order to prevent adverse reactions.

### Genome-wide association studies of ADRs to chemotherapy in the treatment of CRC

Two approaches have been used to identify genetic markers associated with response and/or toxicity, namely candidate genes and genome-wide association studies (GWAS). Most of the data presented above use the candidate gene approach. However, implementation of high-throughput technologies has revealed clinically relevant polymorphisms among millions of SNPs in a single experiment. This approach was recently applied in the field of pharmacogenetics of adverse reactions to chemotherapy for cancer in general [99], and CRC in particular [6,100]. Won *et al.* used GWAS to identify genetic biomarkers for severe oxaliplatin-induced chronic peripheral neuropathy in 96 patients who received 5-FU and oxaliplatin [100]. After validation in a set of 247 patients, multiple regression analysis revealed five SNPs to be statistically significant; these were rs10486003, rs2338, rs843748 (*ACYP2*), rs830884 and rs797519. Fernandez-Rozadilla *et al.* identified SNPs associated with toxicity in CRC patients treated with 5-FU or FOLFOX [6]. An initial GWAS set of 221 patients and a validation set of 791 patients were needed to obtain seven SNPs significantly associated with toxicity; these were rs16857540, rs2465403, rs10876844, rs10784749, rs17626122 and rs4243761. To the best of the authors' knowledge these are the

only two studies describing the use of GWAS to identify SNPs associated with toxicity to CRC chemotherapy. It is difficult to apply these approaches, owing to the high number of patients necessary, the complex nature of the technology involved and the cost of experiments. Large consortiums with thousands of patients are necessary to obtain clinically relevant information that can help us to decrease the adverse effects associated with the drug combinations currently used to treat CRC. This affirmation is obvious for all biomarkers. However, in the case of GWAS, it is absolutely indispensable, given the characteristics of the technique, in which millions of SNPs are analyzed.

### Conclusion & future perspective

The summaries of product characteristics of only two drugs used in CRC have been modified to include warnings recommending genotyping before prescription to prevent or decrease associated ADRs. Research during the last 10 years has provided us with a large amount of data on the pharmacogenetics of adverse reactions in CRC patients receiving chemotherapy. However, as no conclusive findings are available, these results cannot be transferred to clinical practice. Most studies present the same limitations: low patient numbers, heterogeneous groups and different criteria for considering a polymorphism to be 'associated with toxicity'. Studies performed in recent years with large populations have

#### Executive summary

##### Toxicity in colorectal cancer chemotherapy

- Chemotherapy agents used to treat colorectal cancer (CRC) are frequently associated with severe adverse reactions that compromise the efficacy of treatment. Predicting toxicity could enable cancer therapy to be tailored.
- Chemotherapy-induced toxicity is influenced by nongenetic factors such as age, performance status, organ dysfunction and other comorbidities; however, genetic variability can also play an important role.

##### Fluoropyrimidines

- DPYD* genotyping could prove useful for stratifying patients by toxicity risk or for establishing dose recommendations for 5-fluorouracil, capecitabine and tegafur.
- TYMS* and *MTHFR* genotypes are not considered biomarkers for fluoropyrimidine-induced toxicity. The combination of both genotypes is a promising biomarker, although it needs to be investigated in large populations.

##### Oxaliplatin

- Studies on associations between genetic variations in oxaliplatin pathway transporters, or in DNA repair enzymes, and oxaliplatin-induced toxicity are controversial. Genotyping cannot be recommended.

##### Irinotecan

- Identification of CRC patients carrying *UGT1A1*\*28 can be useful for reducing severe irinotecan-induced toxicity, mainly when high doses are administered.
- UGT1A1*\*28 genotyping could be used to increase the irinotecan dose, with no increase in severe toxicity; however, studies in larger populations are needed to validate these promising data.

##### Genome-wide association studies

- Genome-wide association studies are an excellent tool for identifying chemotherapy-induced toxicity biomarkers in CRC. This approach will probably provide interesting data in the coming years.



generally reported negative results, and conclusions are heterogeneous. Consequently, evidence for applying pharmacogenetic testing to prevent chemotherapy-induced ADRs in CRC patients is lacking. Even in the case of *UGT1A1*\*28 for irinotecan and *DPYD*\*2A for fluoropyrimidines, no consensus has been reached in large cohorts. Nevertheless, trends have been confirmed in several studies. Considering the intrinsic variability in treatments, toxicity and statistical validations, we can be optimistic about the future application of pharmacogenetic tests in this field. It seems unlikely that a 100% positive or negative predictive value will be obtained in pharmacogenetics testing for ADRs in patients with CRC. However, considering the high number of drugs and combinations of drugs that can be administered, knowing the probability of developing an ADR to a specific drug could prove extremely

useful for oncologists. Therefore, we consider that testing for *DPYD*\*2A and *UGT1A1*\*28 is justified before administration of fluoropyrimidines and irinotecan, respectively. Finally, GWAS studies with large patient populations are a promising tool, especially in CRC, where the results of many candidate gene-association studies have been poorer than expected.

#### Financial & competing interests disclosure

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

#### References

Papers of special note have been highlighted as:

■ of interest

■■ of considerable interest

- 1 Tsunoda A, Nakao K, Watanabe M, Matsui N, Ooyama A, Kusano M. Associations of various gene polymorphisms with toxicity in colorectal cancer patients receiving oral uracil and tegafur plus leucovorin: a prospective study. *Ann. Oncol.* 22(2), 355–361 (2011).
- 2 Gonzalez-Haba E, Garcia MI, Cortejojo L *et al.* *ABCB1* gene polymorphisms are associated with adverse reactions in fluoropyrimidine-treated colorectal cancer patients. *Pharmacogenomics* 11(12), 1715–1723 (2010).
- Describes polymorphisms differentially associated with 5-fluorouracil (5-FU)- or capecitabine-based chemotherapy.
- 3 Boige V, Mendiboure J, Pignon JP *et al.* Pharmacogenetic assessment of toxicity and outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with LV5FU2, FOLFOX, and FOLFIRI: FFCD 2000-05. *J. Clin. Oncol.* 28(15), 2556–2564 (2010).
- 4 McLeod HL, Sargent DJ, Marsh S *et al.* Pharmacogenetic predictors of adverse events and response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer: results from North American Gastrointestinal Intergroup Trial N9741. *J. Clin. Oncol.* 28(20), 3227–3233 (2010).
- 5 Braun MS, Richman SD, Thompson L *et al.* Association of molecular markers with toxicity outcomes in a randomized trial of chemotherapy for advanced colorectal cancer: the FOCUS trial. *J. Clin. Oncol.* 27(33), 5519–5528 (2009).
- Study with the largest cohort of colorectal cancer patients and focused on adverse reactions.
- 6 Fernandez-Rozadilla C, Cazier JB, Moreno V *et al.* Pharmacogenomics in colorectal cancer: a genome-wide association study to predict toxicity after 5-fluorouracil or FOLFOX administration. *Pharmacogenomics J.* doi: 10.1038/tpj.2012.2 (2012) (Epub ahead of print).
- Very recent genome-wide association study, identifying polymorphisms associated with toxicity in 5-FU-based chemotherapy.
- 7 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 61(2), 69–90 (2011).
- 8 Kelly H, Goldberg RM. Systemic therapy for metastatic colorectal cancer: current options, current evidence. *J. Clin. Oncol.* 23(20), 4553–4560 (2005).
- 9 Raymond E, Faivre S, Woynarowski JM, Chaney SG. Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin. Oncol.* 25(2 Suppl. 5), 4–12 (1998).
- 10 Iyer L, Ratain MJ. Clinical pharmacology of camptothecins. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 42(Suppl. 43), S31–S43 (1998).
- 11 Chua W, Kho PS, Moore MM, Charles KA, Clarke SJ. Clinical, laboratory and molecular factors predicting chemotherapy efficacy and toxicity in colorectal cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 79(3), 224–250 (2011).
- 12 Rougier P, Van Cutsem E, Bajetta E *et al.* Randomised trial of irinotecan versus fluorouracil by continuous infusion after fluorouracil failure in patients with metastatic colorectal cancer. *Lancet* 352(9138), 1407–1412 (1998).
- 13 Saltz LB, Cox JV, Blanke C *et al.* Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N. Engl. J. Med.* 343(13), 905–914 (2000).
- 14 Fuchs CS, Moore MR, Harker G, Villa L, Rinaldi D, Hecht JR. Phase III comparison of two irinotecan dosing regimens in second-line therapy of metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 21(5), 807–814 (2003).
- 15 Pfeiffer P, Mortensen JP, Bjerregaard B *et al.* Patient preference for oral or intravenous chemotherapy: a randomised cross-over trial comparing capecitabine and Nordic fluorouracil/leucovorin in patients with colorectal cancer. *Eur. J. Cancer* 42(16), 2738–2743 (2006).
- 16 de Gramont A, Bosset JF, Milan C *et al.* Randomized trial comparing monthly low-dose leucovorin and fluorouracil bolus with bimonthly high-dose leucovorin and fluorouracil bolus plus continuous infusion for advanced colorectal cancer: a French intergroup study. *J. Clin. Oncol.* 15(2), 808–815 (1997).
- 17 Glimelius B, Sorbye H, Balteskard L *et al.* A randomized Phase III multicenter trial comparing irinotecan in combination with the Nordic bolus 5-FU and folinic acid schedule or the bolus/infused de Gramont schedule (LV5FU2) in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 19(5), 909–914 (2008).
- 18 El-Khouciry AB, Lenz HJ. Should continuous infusion 5-fluorouracil become the standard of care in the USA as it is in Europe? *Cancer Invest.* 24(1), 50–55 (2006).
- 19 Kadoyama K, Miki I, Tamura T, Brown J, Sakaeda T, Okuno Y. Adverse event profiles of 5-fluorouracil and capecitabine: data mining of the public version of the FDA adverse event reporting system, AERS, and reproducibility

- of clinical observations. *Int. J. Med. Sci.* 9(1), 33–39 (2012).
- 20 Diasio RB, Harris BE. Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin. Pharmacokinet.* 16(4), 215–237 (1989).
  - 21 Ciccolini J, Mercier C, Evrard A *et al.* A rapid and inexpensive method for anticipating severe toxicity to fluorouracil and fluorouracil-based chemotherapy. *Ther. Drug Monit.* 28(5), 678–685 (2006).
  - 22 Van Kuilenburg AB, Vreken P, Abeling NG *et al.* Genotype and phenotype in patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Hum. Genet.* 104(1), 1–9 (1999).
  - 23 Gross E, Ullrich T, Seck K *et al.* Detailed analysis of five mutations in dihydropyrimidine dehydrogenase detected in cancer patients with 5-fluorouracil-related side effects. *Hum. Mutat.* 22(6), 498 (2003).
  - 24 Amstutz U, Froehlich TK, Largiadier CR. Dihydropyrimidine dehydrogenase gene as a major predictor of severe 5-fluorouracil toxicity. *Pharmacogenomics* 12(9), 1321–1336 (2011).
  - 25 McDonagh EM, Whirl-Carrillo M, Garten Y, Altman RB, Klein TE. From pharmacogenomic knowledge acquisition to clinical applications: the PharmGKB as a clinical pharmacogenomic biomarker resource. *Biomark. Med.* 5(6), 795–806 (2011).
  - 26 Boisdron-Celle M, Remaud G, Traore S *et al.* 5-Fluorouracil-related severe toxicity: a comparison of different methods for the pretherapeutic detection of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Cancer Lett.* 249(2), 271–282 (2007).
  - 27 Ezzeldin H, Johnson MR, Okamoto Y, Diasio R. Denaturing high performance liquid chromatography analysis of the *DPYD* gene in patients with lethal 5-fluorouracil toxicity. *Clin. Cancer Res.* 9(8), 3021–3028 (2003).
  - 28 Deenen MJ, Tol J, Burylo AM *et al.* Relationship between single nucleotide polymorphisms and haplotypes in *DPYD* and toxicity and efficacy of capecitabine in advanced colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 17(10), 3455–3468 (2011).
  - 29 Kleibl Z, Fidlerova J, Kleiblova P *et al.* Influence of dihydropyrimidine dehydrogenase gene (*DPYD*) coding sequence variants on the development of fluoropyrimidine-related toxicity in patients with high-grade toxicity and patients with excellent tolerance of fluoropyrimidine-based chemotherapy. *Neoplasma* 56(4), 303–316 (2009).
  - 30 Swen JJ, Nijenhuis M, de Boer A *et al.* Pharmacogenetics: from bench to byte – an update of guidelines. *Clin. Pharmacol. Ther.* 89(5), 662–673 (2011).
  - 31 Aschele C, Debernardis D, Casazza S *et al.* Immunohistochemical quantitation of thymidylate synthase expression in colorectal cancer metastases predicts for clinical outcome to fluorouracil-based chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 17(6), 1760–1770 (1999).
  - 32 Afzal S, Gusella M, Jensen SA *et al.* The association of polymorphisms in 5-fluorouracil metabolism genes with outcome in adjuvant treatment of colorectal cancer. *Pharmacogenomics* 12(9), 1257–1267 (2011).
  - 33 Etienne-Grimaldi MC, Milano G, Maindault-Goebel F *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) gene polymorphisms and FOLFOX response in colorectal cancer patients. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 69(1), 58–66 (2010).
  - 34 Ruzzo A, Graziano F, Loupakis F *et al.* Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFOX-4 chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 25(10), 1247–1254 (2007).
  - 35 Thomas F, Motsinger-Reif AA, Hoskins JM *et al.* Methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms and toxicity to 5-FU-based chemoradiation in rectal cancer. *Br. J. Cancer* 105(11), 1654–1662 (2011).
  - Identifies haplotypes of *MTHFR* associated with adverse reactions to 5-FU-based chemotherapy.
  - 36 Goekkurt E, Al-Batran SE, Hartmann JT *et al.* Pharmacogenetic analyses of a Phase III trial in metastatic gastroesophageal adenocarcinoma with fluorouracil and leucovorin plus either oxaliplatin or cisplatin: a study of the arbeitgemeinschaft internistische onkologie. *J. Clin. Oncol.* 27(17), 2863–2873 (2009).
  - 37 Kristensen MH, Pedersen PL, Melsen GV, Ellehaug J, Mejer J. Variants in the dihydropyrimidine dehydrogenase, methylenetetrahydrofolate reductase and thymidylate synthase genes predict early toxicity of 5-fluorouracil in colorectal cancer patients. *J. Int. Med. Res.* 38(3), 870–883 (2010).
  - 38 Afzal S, Gusella M, Vainer B *et al.* Combinations of polymorphisms in genes involved in the 5-fluorouracil metabolism pathway are associated with gastrointestinal toxicity in chemotherapy-treated colorectal cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 17(11), 3822–3829 (2011).
  - 39 van der Put NM, Gabreels F, Stevens EM *et al.* A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am. J. Hum. Genet.* 62(5), 1044–1051 (1998).
  - 40 Capitain O, Boisdron-Celle M, Poirier AL, Abadie-Lacourtoisie S, Morel A, Gamelin E. The influence of fluorouracil outcome parameters on tolerance and efficacy in patients with advanced colorectal cancer. *Pharmacogenomics* 12(9), 256–267 (2008).
  - 41 Sharma R, Hoskins JM, Rivory LP *et al.* Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and toxicity to capecitabine in advanced colorectal cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 14(3), 817–825 (2008).
  - Studies *TYMS* and *MTHFR*, associating polymorphisms in these genes with toxicity in capecitabine-treated patients.
  - 42 Gusella M, Frigo AC, Bolzonella C *et al.* Predictors of survival and toxicity in patients on adjuvant therapy with 5-fluorouracil for colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 100(10), 1549–1557 (2009).
  - 43 Chua W, Goldstein D, Lee CK *et al.* Molecular markers of response and toxicity to FOLFOX chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 101(6), 998–1004 (2009).
  - 44 Glimelius B, Garmo H, Berglund A *et al.* Prediction of irinotecan and 5-fluorouracil toxicity and response in patients with advanced colorectal cancer. *Pharmacogenomics* 11(1), 61–71 (2011).
  - 45 Taflin H, Wettergren Y, Odin E, Carlsson G, Derwinger K. Gene polymorphisms *MTHFR*C677T and *MTR*A2756G as predictive factors in adjuvant chemotherapy for stage III colorectal cancer. *Anticancer Res.* 31(9), 3057–3062 (2011).
  - 46 Tibaldi C, Giovannetti E, Vasile E *et al.* Correlation of *CDA*, *ERCC1*, and *XPB* polymorphisms with response and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin. Cancer Res.* 14(6), 1797–1803 (2008).
  - 47 Ueno H, Kaniwa N, Okusaka T *et al.* Homozygous *CDA\*3* is a major cause of life-threatening toxicities in gemcitabine-treated Japanese cancer patients. *Br. J. Cancer* 100(6), 870–873 (2009).
  - 48 Caronia D, Martin M, Sastre J *et al.* A polymorphism in the cytidine deaminase promoter predicts severe capecitabine-induced hand–foot syndrome. *Clin. Cancer Res.* 17(7), 2006–2013 (2011).
  - 49 Kaida Y, Inui N, Suda T, Nakamura H, Watanabe H, Chida K. The *CYP2A6\*4* allele is determinant of S-1 pharmacokinetics in Japanese patients with non-small-cell lung cancer. *Clin. Pharmacol. Ther.* 83(4), 589–594 (2008).
  - 50 Hirose T, Fujita K, Nishimura K *et al.* Pharmacokinetics of S-1 and *CYP2A6* genotype in Japanese patients with advanced cancer. *Oncol. Rep.* 24(2), 529–536 (2010).
  - 51 Kim KP, Jang G, Hong YS *et al.* Phase II study of S-1 combined with oxaliplatin as therapy for patients with metastatic biliary

- tract cancer: influence of the *CYP2A6* polymorphism on pharmacokinetics and clinical activity. *Br. J. Cancer* 104(4), 605–612 (2011).
- 52 Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione *S*-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30(6), 445–600 (1995).
  - 53 Ali-Osman F, Akande O, Antoun G, Mao JX, Buolamwini J. Molecular cloning, characterization, and expression in *Escherichia coli* of full-length cDNAs of three human glutathione *S*-transferase P1 gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J. Biol. Chem.* 272(15), 10004–10012 (1997).
  - 54 Chen YC, Tzeng CH, Chen PM *et al.* Influence of *GSTP1* I105V polymorphism on cumulative neuropathy and outcome of FOLFOX-4 treatment in Asian patients with colorectal carcinoma. *Cancer Sci.* 101(2), 530–535 (2010).
  - 55 Pare L, Marcuello E, Altes A *et al.* Pharmacogenetic prediction of clinical outcome in advanced colorectal cancer patients receiving oxaliplatin/5-fluorouracil as first-line chemotherapy. *Br. J. Cancer* 99(7), 1050–1055 (2008).
  - 56 Kwekel DM, Koopman M, Antonini NF *et al.* *GSTP1* Ile105Val polymorphism correlates with progression-free survival in MCRC patients treated with or without irinotecan: a study of the Dutch Colorectal Cancer Group. *Br. J. Cancer* 99(8), 1316–1321 (2008).
  - 57 Kwekel DM, Gelderblom H, Antonini NF *et al.* Glutathione-*S*-transferase pi (*GSTP1*) codon 105 polymorphism is not associated with oxaliplatin efficacy or toxicity in advanced colorectal cancer patients. *Eur. J. Cancer* 45(4), 572–578 (2009).
  - 58 Lecomte T, Landi B, Beaune P, Laurent-Puig P, Lorient MA. Glutathione *S*-transferase P1 polymorphism (Ile105Val) predicts cumulative neuropathy in patients receiving oxaliplatin-based chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 12(10), 3050–3056 (2006).
  - 59 Inada M, Sato M, Morita S *et al.* Associations between oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and polymorphisms of the *ERCC1* and *GSTP1* genes. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 48(11), 729–734 (2010).
  - 60 Agostini M, Pasetto LM, Pucciarelli S *et al.* Glutathione *S*-transferase P1 Ile105Val polymorphism is associated with haematological toxicity in elderly rectal cancer patients receiving preoperative chemoradiotherapy. *Drugs Aging* 25(6), 531–539 (2008).
  - 61 Chang PM, Tzeng CH, Chen PM *et al.* *ERCC1* codon 118 C→T polymorphism associated with *ERCC1* expression and outcome of FOLFOX-4 treatment in Asian patients with metastatic colorectal carcinoma. *Cancer Sci.* 100(2), 278–283 (2009).
  - 62 Lai JI, Tzeng CH, Chen PM *et al.* Very low prevalence of *XPD* K751Q polymorphism and its association with *XPD* expression and outcomes of FOLFOX-4 treatment in Asian patients with colorectal carcinoma. *Cancer Sci.* 100(7), 1261–1266 (2009).
  - 63 Duell EJ, Wiencke JK, Cheng TJ *et al.* Polymorphisms in the DNA repair genes *XRCC1* and *ERCC2* and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis* 21(5), 965–971 (2000).
  - 64 Wang Z, Xu B, Lin D *et al.* *XRCC1* polymorphisms and severe toxicity in lung cancer patients treated with cisplatin-based chemotherapy in Chinese population. *Lung Cancer* 62(1), 99–104 (2008).
  - 65 Iyer L, King CD, Whittington PF *et al.* Genetic predisposition to the metabolism of irinotecan (CPT-11). Role of uridine diphosphate glucuronosyltransferase isoform 1A1 in the glucuronidation of its active metabolite (SN-38) in human liver microsomes. *J. Clin. Invest.* 101(4), 847–854 (1998).
  - 66 Ciotti M, Basu N, Brangi M, Owens IS. Glucuronidation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) by the human UDP-glucuronosyltransferases encoded at the *UGT1* locus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260(1), 199–202 (1999).
  - 67 Gagne JF, Montminy V, Belanger P, Journault K, Gaucher G, Guillemette C. Common human *UGT1A* polymorphisms and the altered metabolism of irinotecan active metabolite 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38). *Mol. Pharmacol.* 62(3), 608–617 (2002).
  - 68 Hanioka N, Ozawa S, Jinno H, Ando M, Saito Y, Sawada J. Human liver UDP-glucuronosyltransferase isoforms involved in the glucuronidation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin. *Xenobiotica* 31(10), 687–699 (2001).
  - 69 Iyer L, Das S, Janisch L *et al.* *UGT1A1*\*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity. *Pharmacogenomics J.* 2(1), 43–47 (2002).
  - 70 Marcuello E, Altes A, Menoyo A, Del Rio E, Gomez-Pardo M, Baiget M. *UGT1A1* gene variations and irinotecan treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 91(4), 678–682 (2004).
  - 71 Martínez-Balibrea E, Abad A, Martínez-Cardus A *et al.* *UGT1A* and *TYMS* genetic variants predict toxicity and response of colorectal cancer patients treated with first-line irinotecan and fluorouracil combination therapy. *Br. J. Cancer* 103(4), 581–589 (2010).
  - 72 Massacesi C, Terrazzino S, Marcucci F *et al.* Uridine diphosphate glucuronosyl transferase 1A1 promoter polymorphism predicts the risk of gastrointestinal toxicity and fatigue induced by irinotecan-based chemotherapy. *Cancer* 106(5), 1007–1016 (2006).
  - 73 Rouits E, Charasson V, Petain A *et al.* Pharmacokinetic and pharmacogenetic determinants of the activity and toxicity of irinotecan in metastatic colorectal cancer patients. *Br. J. Cancer* 99(8), 1239–1245 (2008).
  - 74 Innocenti F, Undevia SD, Iyer L *et al.* Genetic variants in the UDP-glucuronosyltransferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J. Clin. Oncol.* 22(8), 1382–1388 (2004).
  - 75 Bason P, Masier S, Toffoli G. *UGT1A1*\*28 and other *UGT1A* polymorphisms as determinants of irinotecan toxicity. *J. Chemother.* 20(2), 158–165 (2008).
  - 76 Cecchin E, Innocenti F, D'Andrea M *et al.* Predictive role of the *UGT1A1*, *UGT1A7*, and *UGT1A9* genetic variants and their haplotypes on the outcome of metastatic colorectal cancer patients treated with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan. *J. Clin. Oncol.* 27(15), 2457–2465 (2009).
  - 77 Cote JF, Kirzin S, Kramar A *et al.* *UGT1A1* polymorphism can predict hematologic toxicity in patients treated with irinotecan. *Clin. Cancer Res.* 13(11), 3269–3275 (2007).
  - 78 Kwekel DM, Gelderblom H, Van der Straaten T, Antonini NF, Punt CJ, Guchelaar HJ. *UGT1A1*\*28 genotype and irinotecan dosage in patients with metastatic colorectal cancer: a Dutch Colorectal Cancer Group study. *Br. J. Cancer* 99(2), 275–282 (2008).
  - 79 Liu CY, Chen PM, Chiou TJ *et al.* *UGT1A1*\*28 polymorphism predicts irinotecan-induced severe toxicities without affecting treatment outcome and survival in patients with metastatic colorectal carcinoma. *Cancer* 112(9), 1932–1940 (2008).
  - 80 Shulman K, Cohen I, Barnett-Griness O *et al.* Clinical implications of *UGT1A1*\*28 genotype testing in colorectal cancer patients. *Cancer* 117(14), 3156–3162 (2011).
  - 81 Toffoli G, Cecchin E, Corona G *et al.* The role of *UGT1A1*\*28 polymorphism in the pharmacodynamics and pharmacokinetics of irinotecan in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 24(19), 3061–3068 (2006).
  - 82 Hoskins JM, Goldberg RM, Qu P, Ibrahim JG, McLeod HL. *UGT1A1*\*28 genotype and irinotecan-induced neutropenia: dose matters. *J. Natl Cancer Inst.* 99(17), 1290–1295 (2007).



- 83 Schulz C, Heinemann V, Schalhorn A *et al*. *UGT1A1* gene polymorphism: impact on toxicity and efficacy of irinotecan-based regimens in metastatic colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 15(40), 5058–5066 (2009).
- 84 Marcuello E, Paez D, Pare L *et al*. A genotype-directed Phase I–IV dose-finding study of irinotecan in combination with fluorouracil/leucovorin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 105(1), 53–57 (2011).
- Study of *TYMS* and *MTHFR* associating polymorphisms in these genes with toxicity in capecitabine-treated patients.
- 85 Innocenti F, Kroetz DL, Schuetz E *et al*. Comprehensive pharmacogenetic analysis of irinotecan neutropenia and pharmacokinetics. *J. Clin. Oncol.* 27(16), 2604–2614 (2009).
- 86 Ferraldeschi R, Minchell LJ, Roberts SA *et al*. *UGT1A1*\*28 genotype predicts gastrointestinal toxicity in patients treated with intermediate-dose irinotecan. *Pharmacogenomics* 10(5), 733–739 (2009).
- 87 Okuyama Y, Hazama S, Nozawa H *et al*. Prospective Phase II study of FOLFIRI for mCRC in Japan, including the analysis of *UGT1A1* 28/6 polymorphisms. *Jpn J. Clin. Oncol.* 41(4), 477–482 (2011).
- 88 Jada SR, Lim R, Wong CI *et al*. Role of *UGT1A1*\*6, *UGT1A1*\*28 and *ABCG2* c.421C>A polymorphisms in irinotecan-induced neutropenia in Asian cancer patients. *Cancer Sci.* 98(9), 1461–1467 (2007).
- 89 Carlini LE, Meropol NJ, Bever J *et al*. *UGT1A7* and *UGT1A9* polymorphisms predict response and toxicity in colorectal cancer patients treated with capecitabine/irinotecan. *Clin. Cancer Res.* 11(3), 1226–1236 (2005).
- 90 Fujita K, Ando Y, Nagashima F *et al*. Genetic linkage of *UGT1A7* and *UGT1A9* polymorphisms to *UGT1A1*\*6 is associated with reduced activity for SN-38 in Japanese patients with cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 60(4), 515–522 (2007).
- 91 Han JY, Lim HS, Shin ES *et al*. Comprehensive analysis of *UGT1A* polymorphisms predictive for pharmacokinetics and treatment outcome in patients with non-small-cell lung cancer treated with irinotecan and cisplatin. *J. Clin. Oncol.* 24(15), 2237–2244 (2006).
- 92 Rhodes KE, Zhang W, Yang D *et al*. *ABCB1*, *SLCO1B1* and *UGT1A1* gene polymorphisms are associated with toxicity in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line irinotecan. *Drug Metab. Lett.* 1(1), 23–30 (2007).
- 93 Sai K, Saito Y, Fukushima-Uesaka H *et al*. Impact of *CYP3A4* haplotypes on irinotecan pharmacokinetics in Japanese cancer patients. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 62(3), 529–537 (2008).
- 94 van der Bol JM, Mathijssen RH, Creemers GJ *et al*. A *CYP3A4* phenotype-based dosing algorithm for individualized treatment of irinotecan. *Clin. Cancer Res.* 16(2), 736–742 (2010).
- 95 Hoskins JM, Marcuello E, Altes A *et al*. Irinotecan pharmacogenetics: influence of pharmacodynamic genes. *Clin. Cancer Res.* 14(6), 1788–1796 (2008).
- 96 Baas JM, Krens LL, Guchelaar HJ *et al*. Recommendations on management of EGFR inhibitor-induced skin toxicity: a systematic review. *Cancer Treat. Rev.* 38(5), 505–514 (2012).
- 97 Dahan L, Norguet E, Etienne-Grimaldi MC *et al*. Pharmacogenetic profiling and cetuximab outcome in patients with advanced colorectal cancer. *BMC Cancer* 11, 496 (2011).
- 98 Graziano F, Ruzzo A, Loupakis F *et al*. Pharmacogenetic profiling for cetuximab plus irinotecan therapy in patients with refractory advanced colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 26(9), 1427–1434 (2008).
- 99 Kiyotani K, Uno S, Mushiroda T *et al*. A genome-wide association study identifies four genetic markers for hematological toxicities in cancer patients receiving gemcitabine therapy. *Pharmacogenet. Genomics* 22(4), 229–235 (2012).
- 100 Won HH, Lee J, Park JO *et al*. Polymorphic markers associated with severe oxaliplatin-induced, chronic peripheral neuropathy in colon cancer patients. *Cancer* 118(11), 2828–2836 (2012).
- 101 Caussanel JP, Lévi F, Brienza S *et al*. Phase I trial of 5-day continuous venous infusion of oxaliplatin at circadian rhythm-modulated rate compared with constant rate. *J. Natl Cancer Inst.* 82(12), 1046–1050 (1990).
- Websites
- 201 Online application for the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE). <https://webapps.ctep.nci.nih.gov/webobj/s/ctc/webhelp/whnjs.htm>
- 202 Online access to WHO adverse reactions classification. [www.who.int/medicines/areas/quality\\_safety/safety\\_efficacy/advdrugreactions/en](http://www.who.int/medicines/areas/quality_safety/safety_efficacy/advdrugreactions/en)
- 203 Table of US FDA-approved pharmacogenomic biomarkers in drug labels. [www.fda.gov/drugs/scienceresearch/researchareas/pharmacogenetics/ucm083378.htm](http://www.fda.gov/drugs/scienceresearch/researchareas/pharmacogenetics/ucm083378.htm)
- 204 European Medicines Agency. [www.ema.europa.eu/ema](http://www.ema.europa.eu/ema)
- 205 The Pharmacogenomics Knowledge Base. [www.pharmgkb.org](http://www.pharmgkb.org)



## ANEXO 4



## RESEARCH ARTICLE

For reprint orders, please contact: [reprints@futuremedicine.com](mailto:reprints@futuremedicine.com)

## *ABCB1* gene polymorphisms are associated with adverse reactions in fluoropyrimidine-treated colorectal cancer patients

**Aim:** To find out whether SNPs in the transporter gene ATP-binding cassette B1 (*ABCB1*) were related to adverse effects in colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil (5-FU) or capecitabine. **Materials & methods:** Patients treated with a 5-FU-based therapy (n = 67) or a capecitabine-based therapy (n = 74) were recruited and genotyped for the *ABCB1* SNPs rs1128503 (C1236T), rs2032592 (G2677T/A) and rs1045642 (C3435T). Clinical data and adverse reactions were recorded. *ABCB1* genotypes of patients were statistically analyzed for association with the most frequent adverse reactions. **Results:** Statistical associations were observed, suggesting a lower risk of neutropenia (p = 0.013) and hand-foot syndrome (HFS; p = 0.027) for the carriers of T variation for rs1128503 in capecitabine-treated patients, carriers of T variation for rs1045642 treated with capecitabine had a lower risk of HFS (p = 0.033), while those treated with 5-FU had a higher risk of diarrhea (p = 0.035), and carriers of T variation for rs2032592 treated with capecitabine were at less risk of developing HFS (p = 0.033). **Conclusion:** This is the first time evidence has been found of differing pharmacogenetic markers for capecitabine and 5-FU treatments. Genotyping of SNPs in the *ABCB1* gene prior to chemotherapy administration could help reduce adverse reactions in colorectal cancer patients.

**KEYWORDS:** 5-fluorouracil • adverse reactions capecitabine • ATP-binding cassette B1 • pharmacogenetics

Colorectal cancer is the second leading cause of cancer-related deaths in the Western world, leading to 655,000 deaths per year worldwide [1]. Treatments include 5-fluorouracil (5-FU) or capecitabine (a precursor of 5-FU) in different combinations with irinotecan or oxaliplatin and/or the recently approved monoclonal antibodies cetuximab, bevacizumab or panitumumab. These therapies have improved patient responses and prolonged overall survival over the last decade. However, a high percentage of patients do not respond to treatment and a not insignificant proportion present moderate-to-severe chemotherapy-induced toxicity, such as neutropenia, diarrhea, sensory neuropathy and asthenia. Capecitabine was developed as a prodrug of 5-FU with the goal of improving tolerability and intratumor drug concentration through tumor-specific conversion to the active drug. Nonetheless, the drugs are considered to be analogs. However, in terms of toxicity, there are differences. Capecitabine induces less severe neutropenia and stomatitis but causes an increase in severe hand-foot syndrome (HFS) [2]. Studies have associated some of these adverse reactions with variations in the patient genome [3]. Genetic polymorphisms in the *DPYD*, *MTHFR* and *TYMS* genes have been extensively related to

both toxicity and efficacy in patients treated with 5-FU or capecitabine achieving limited and contradictory results [4]. However, more genetic factors need to be identified to explain variability in toxicity and response to chemotherapy treatment.

Transporter and metabolism genes have been widely studied in pharmacogenetics and are considered some of the most important factors in each individual's response to drugs. One of these genes is the ATP-binding cassette (ABC)B1 (*ABCB1*), also known as multidrug-resistance 1 (*MDR1*). The *ABCB1* gene is a member of the ABC transporter superfamily and its protein product is called P-glycoprotein (P-gp). *ABCB1* overexpression in tumors has been implicated in multidrug resistance to cancer chemotherapeutic agents [5]. *ABCB1* is a highly polymorphic gene with remarkable differences among different ethnicities [6,7]. Some of the most commonly studied variants are rs1128503 (C1236T), rs2032592 (G2677A/T) and rs1045642 (C3435T) and the most commonly-studied haplotype involves these three SNPs. Significant differences in haplotype distributions were found between colorectal cancer patients and a healthy population [8]. To date, there is no clear consensus on the impact of any of these variants on

Eva Gonzalez-Haba<sup>1</sup>,  
María I García<sup>1</sup>,  
Lucia Cortejoso<sup>1</sup>,  
Carolina López-Lillo<sup>1</sup>,  
Nérida Barrueco<sup>1</sup>,  
Pilar García-Alfonso<sup>2</sup>,  
Sonsoles Alvarez<sup>2</sup>,  
Jose L Jiménez<sup>3</sup>,  
María L Martín<sup>1</sup>,  
María A Muñoz-  
Fernández<sup>4</sup>,  
María Sanjurjo<sup>1</sup>  
& Luis A López-  
Fernández<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Pharmacogenetics & Pharmacogenomics, Pharmacy Service, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Medical Oncology Department, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

<sup>3</sup>Plataforma de Laboratorio, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

<sup>4</sup>Laboratory of Immunobiology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Spain

\*Author for correspondence:

Tel.: +34 914 265 026

Fax: +34 915 866 621

[llopezf.hugum@salud.madrid.org](mailto:llopezf.hugum@salud.madrid.org)

future  
medicine <sup>part of</sup> fsg

drug disposition or response, or toxicity to different drugs. These *ABCB1* polymorphisms have been studied as predictors of response to 5-FU in colorectal cancer with contradictory results. The C3435T polymorphisms did not correlate with early relapse in high-risk stage II and stage III colorectal cancer patients [9], and G2677T/A and C3435T polymorphisms did not correlate with long-term prognosis in stage II-B or III-C colorectal cancer patients treated with 5-FU/leucovorin [10]. In contrast, they have been shown to be a predictive biomarker of 5-FU-based treatment effectiveness [8]. However, few studies have focused on toxicity, despite the fact that toxicity is generally related to efficacy. Recently, genetic variations in *ABCB1* were associated with both early toxicity and lower response to 5-FU/irinotecan treatment [11], but there have been no comparative studies on 5-FU- or capecitabine-based chemotherapy.

The aim of the study was to evaluate the putative associations between *ABCB1* polymorphisms (rs1128503, rs2032592 and rs1045642) and adverse effects developed by colorectal cancer patients taking 5-FU- or capecitabine-based treatments.

## Materials & methods

### ■ Patients

All patients were recruited from Hospital Gregorio Marañón (Madrid, Spain). Inclusion criteria were: a diagnosis of colorectal cancer in any stage; receiving chemotherapy containing 5-FU or capecitabine in any line of treatment; aged over 18 years; and must have signed the informed consent form. Exclusion criteria were as follows: noncompliance with any of the inclusion criteria; performance status score higher than 2; less than 2 months of treatment unless adverse effects grade II or higher are observed. This was a retrospective analysis of 67 patients diagnosed with colorectal cancer taking 5-FU alone or in combination with other drugs and 74 taking capecitabine alone or in combination with other drugs. As we were looking for adverse reactions to chemotherapy, we included adjuvant treatment and patients with metastases. Adverse reactions were listed for each treatment. The research was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Hospital ethics committee. Informed consent was obtained from all patients. Patient clinical data were collected: age, gender, treatment, toxicity (neutropenia, diarrhea, HFS, neuropathy and asthenia); and drugs included in their chemotherapy.

The NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0 (CTCAE) [101] was used for toxicity classification.

### ■ DNA extraction

Genomic DNA from each enrolled patient was isolated from 200 µl whole blood using a QiAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). DNA concentration was measured in a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific, MA, USA).

### ■ Genotyping

*ABCB1* polymorphisms rs1045642 (C3435T), rs2032582 (G2677T/A) and rs1128503 (C1236T) were genotyped by the SNaPshot technique. Multiplex reactions were performed using a Qiagen PCR kit (Qiagen) according to manufacturer recommendations with the following PCR conditions: 95°C for 15 min, 40 cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 90 s, 72°C for 90 s, and a final extension of 72°C for 5 min. Oligonucleotides used in PCR amplifications were: ABCB1\_1236R (TAT CCT GTG TCT GTG AAT TGC C), ABCB1\_1236F (CCT GAC TCA CCA CAC CAA TG), ABCB1\_3435R (GTA ACT TGG CAG TTT CAG TG), ABCB1\_3435F (CAT GCT CCC AGG CTG TTT AT), ABCB1\_2677R (GGC TAT AGG TTC CAG GCT TG), ABCB1\_2677F (GAC AAG CAC TGA AAG ATA AGA AAG AAC TAG AAG GT). Multiplex PCR products were purified by ExoSapIt (USB, Affymetrix, CA, USA; 37°C for 1 h and 80°C for 20 min) and subjected to electrophoresis using a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, CA, USA). Genetic variations were analyzed by SNaPshot using the SNaPshot Multiplex System (Applied Biosystems, CA, USA) with the following oligonucleotides: ABCB1-1236 (GCC ACA TCT GCA CCT TCA GGT TCA G), ABCB1-2667 (TAA TCA ATC ATA TTT AGT TTG ACT CAC CTT CCC AG) and ABCB1-3435 (TGA CTC GAT GAA GGC ATG TAT GTT GGC CTC CTT TGC TGC CCT CAC). For SNaPshot reactions, 3 µl of purified multiplex PCR was incubated in 2X Mix SNaPshot and 0.2 µM of each oligonucleotide in a final volume of 10 µl under the following conditions: 25 cycles of 96°C for 10 s, 50°C for 5 s, and 60°C for 30 s. After the addition of 1 µl alkaline phosphatase, reactions were incubated at 37°C for 1 h and at 75°C for 15 min. Finally, 1 µl of each SNaPshot reaction was mixed with 9 µl formamide and 0.5 µl

ladder marker (Applied). SNaPshot reactions were loaded onto an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) and analyzed using GeneMapper software v3.2.

#### ■ Statistical analysis

All data were analyzed using the Statistical Package for the Social Sciences v.16 (SPSS, Inc.). We used Fisher's exact test and linear-by-linear association  $\chi^2$  test to study the association between polymorphisms and grade of adverse effect (a value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant).

#### Results

All patients diagnosed with colorectal cancer and incorporated into the study were genotyped for SNPs rs1045642, rs2032582 and rs1128503 in the *ABCB1* gene. Median age, gender, performance status, cancer type, tumor stage and other chemotherapeutic drugs used are shown in TABLE 1. The percentage of patients receiving another drug in combination with 5-FU or capecitabine is also shown. These rates are similar for both treatments, the difference being very small. Oxaliplatin and cetuximab are more frequently combined with 5-FU (77 and 11%, respectively) than with capecitabine (54 and 1%, respectively), while irinotecan is more frequently used in combination with capecitabine (32 vs 17%). The most common adverse reactions to treatments observed were neutropenia, diarrhea and HFS. Based on the CTCAE [10], patients were grouped as negative (grades 0 and I) or positive (grades II–IV). According to these criteria, 41.8 and 13.5% of patients presented with moderate-to-severe neutropenia when taking 5-FU or capecitabine, respectively (TABLE 2). In addition, 28.4% and 31.1% presented moderate-to-severe diarrhea after administration of 5-FU or capecitabine, respectively. For the other adverse effects, higher incidences of neuropathy and asthenia were observed in 5-FU-treated patients and of HFS in capecitabine-treated patients. These figures are higher than those published by other authors [12–14] because in our study, grade II adverse reactions were included. We decided to include this group given that this is not a clinical trial and, in clinical practice, chemotherapy is often reduced or changed in patients who develop a grade II adverse reaction to the first treatment cycles or in whom the adverse reaction persists during treatment. Results from the statistical comparison of the polymorphisms of interest and neutropenia, diarrhea and HFS in patients undergoing treatments with 5-FU or capecitabine are shown in TABLE 3.

Table 1. Main characteristics of patients.

Parameter	Capecitabine, n (%)	5-FU, n (%)
<b>Patients</b>		
Men	44 (59.5)	35 (52.2%)
Women	30 (40.5)	32 (47.8%)
Total	74	67
<b>Median age (years)</b>		
Men	68	61
Women	70	62
Total	69	62
<b>Performance status</b>		
Men		
– 0	27 (61.4)	17 (48.6)
– 1	13 (29.5)	17 (48.6)
– >1	4 (9.1)	1 (2.8)
Women		
– 0	18 (60)	21 (65.6)
– 1	11 (36.7)	10 (31.3)
– >1	1 (3.3)	1 (3.1)
Total		
– 0	45 (60.8)	38 (56.7)
– 1	24 (32.4)	27 (40.3)
– >1	5 (6.8)	2 (3)
<b>Type of cancer</b>		
Men		
– Colon	31 (70.5)	20 (57.1)
– Rectum	13 (29.5)	15 (42.9)
Women		
– Colon	22 (73.3)	22 (68.7)
– Rectum	8 (26.6)	10 (31.3)
Total		
– Colon	53 (71.6)	42 (62.7)
– Rectum	21 (28.4)	25 (37.3)
<b>Grade of tumor</b>		
II	14 (18.9)	5 (7.5)
III	17 (23.0)	14 (20.9)
IV	43 (58.1%)	48 (71.6)
<b>Other drugs</b>		
Oxaliplatin	40 (54.0)	52 (77.6)
Bevacizumab	29 (39.2)	26 (38.8)
Irinotecan	24 (32.4)	12 (17.9)
Cetuximab	1 (1.4)	8 (11.9)
5-FU: 5-fluorouracil.		

In patients treated with capecitabine-based chemotherapy, statistically significant associations were found between moderate-to-severe neutropenia and rs1128503 SNP ( $p = 0.013$ ), and between moderate-to-severe HFS and the three *ABCB1* SNPs studied (rs1128503  $p = 0.027$ ; rs2032582  $p = 0.048$ ; rs1045642  $p = 0.033$ ).



Table 2. Adverse reactions to fluoropyrimidine-treatments in colorectal patients.

Adverse reaction	Grade	Capecitabine, n (%)	5-FU, n (%)
Diarrhea	0–I	51 (68.9)	48 (71.6)
	II–IV	23 (31.1)	19 (28.4)
Neutropenia	0–I	64 (86.5)	39 (58.2)
	II–IV	10 (13.5)	28 (41.8)
Neuropathy	0–I	57 (77)	46 (68.6)
	II–IV	17 (23)	21 (31.3)
Hand–foot syndrome	0–I	61 (82.4)	65 (97)
	II–IV	13 (17.6)	2 (3)
Asthenia	0–I	61 (82.4)	37 (55.2)
	II–IV	13 (17.6)	30 (44.8)

Adverse events were classified from grade 0 to IV using NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0.  
5-FU: 5-fluorouracil.

The most relevant finding was that none of the 18 patients with genotype T/T in position 1236 of *ABCB1* for both alleles presented moderate-to-severe neutropenia. It seems the T/T genotype in the rs1128503 SNP of the *ABCB1* gene protects patients from neutropenia caused by capecitabine treatment but not 5-FU (TABLE 3). To rule out the possible effects of irinotecan on the results, a new analysis was performed, excluding those who were also treated with irinotecan from both groups of patients. Results showed that there was still a statistically significant association between neutropenia and rs1128503 ( $p = 0.045$ ). Of patients with moderate-to-severe neutropenia possessing the rs1128503 genotype, 29.4% were CC homozygous patients, 12.8% were CT heterozygous, and 0% were TT homozygous. When capecitabine–irinotecan-treated patients were excluded, the rates of moderate-to-severe neutropenia associated with each genotype were 30.8% for CC homozygous, 13.3% for CT heterozygous and 0% for TT homozygous (TABLES 4 & 5). These results are comparable to those obtained when capecitabine–irinotecan-treated patients are included in the study, demonstrating that the association of rs1045642 with neutropenia in capecitabine-based treatment is independent of irinotecan. However, there was no longer any statistical association between rs1045642 and HFS when irinotecan combinations were removed from the analysis. Despite that, of the patients with HFS grade II or higher, the rates were 30.8, 16.7 and 9.1% for CC, CT and TT, respectively. Thus, the proportion of capecitabine-treated patients by genotype remains quite similar when irinotecan treatments are removed from the analysis and the result would seem to be a limitation of the sample size.

SNP rs1045642 was also statistically associated with diarrhea in patients on a 5-FU-based regimen ( $p = 0.037$ ) (TABLE 3). Patients homozygous for this SNP showed a higher probability of presenting moderate-to-severe diarrhea (42.9%) than heterozygous (34.4%) or homozygous wild-type (9.5%). When irinotecan-treated patients were excluded from the analysis, results remain similar, with 38.5% for mutant homozygous, 27.6% for heterozygous and 10% for wild-type homozygous (TABLES 4 & 5), but this association was not more statistically significant, probably due to sample size.

FIGURE 1 shows an overview of the probabilities of developing neutropenia, diarrhea and/or HFS depending on *ABCB1* genotype and drug using the data from TABLE 3. For those with a homozygous mutant or heterozygous SNP, the advantage of capecitabine treatment is clear. Being homozygous mutant or heterozygous for all the analyzed SNPs in the *ABCB1* gene results in a lower probability of moderate-to-severe neutropenia and moderate-to-severe HFS in a capecitabine-based treatment compared with CC homozygous. However, possessing homozygous wild-type means a lower probability of having moderate-to-severe diarrhea on 5-FU-based treatment compared with heterozygous and homozygous TT.

## Discussion

Predicting efficacy and/or toxicity is the major goal of pharmacogenetics. A table containing valid genomic biomarkers already present on approved drug labels has been published by the US FDA [102]. Several of these correspond to drugs used in colorectal cancer, such as *DPYD* for capecitabine and 5-FU, *KRAS* for cetuximab and panitumumab and *UGT1A1* for irinotecan. In this prospective study, we demonstrated that polymorphisms in the *ABCB1* gene are biomarkers for toxicity in colorectal cancer patients treated with capecitabine or 5-FU chemotherapy. The small differences observed in the drug used in combination with 5-FU or capecitabine are probably caused by the higher proportion of advanced cancer in the 5-FU group (71 vs 58%) given that in these cases, a combination containing 5-FU is more frequently used. However, we consider that these differences are small and the associations found between adverse reactions and polymorphisms in *ABCB1* are related to treatment with fluoropyrimidines. Results showed that for those patients with one or two variant forms of the analyzed SNPs, the advantage of capecitabine treatment in terms of the lower

Table 3. Associations between *ABCB1* SNPs and adverse events in patients treated with capecitabine-based or 5-fluorouracil-based chemotherapy.

Genotypes	Patients, n (%)	Neutropenia patients, n (%)			Diarrhea patients, n (%)			HFS patients, n (%)		
		0–I	II–IV	p-value	0–I	II–IV	p-value	0–I	II–IV	p-value
Capecitabine-based treatment										
ABCB1 1236 (rs1128503)										
– C/C	17 (23)	12 (70.6)	5 (29.4)	0.013**	11 (64.7)	6 (35.3)	1	11 (64.7)	6 (35.3)	0.027**
– C/T	39 (52.7)	34 (87.2)	5 (12.8)		28 (71.8)	11 (28.2)		33 (84.6)	6 (15.4)	
– T/T	18 (24.3)	18 (100)	0 (0)		12 (66.7)	6 (33.3)		17 (94.4)	1 (5.6)	
ABCB1 2667 (rs2032582)										
– G/G	22 (29.7)	17 (77.3)	5 (22.7)	0.083	13 (59.1)	9 (40.9)	0.373	14 (63.6)	8 (36.4)	0.048**
– G/TA	38 (51.4)	33 (86.8)	5 (13.2)		28 (73.7)	10 (26.3)		35 (92.1)	3 (7.9)	
– T/T	14 (18.9)	14 (100)	0 (0)		10 (71.4)	4 (28.6)		12 (85.7)	2 (14.3)	
ABCB1 3435 (rs1045642)										
– C/C	16 (21.6)	13 (81.2)	3 (18.8)	0.191	10 (62.5)	6 (37.5)	0.567	10 (62.5)	6 (37.5)	0.033**
– C/T	43 (58.1)	36 (83.7)	7 (16.3)		30 (69.8)	13 (30.2)		37 (86)	6 (14)	
– T/T	15 (20.3)	15 (100)	0 (0)		11 (73.6)	4 (26.7)		14 (93.3)	1 (17.6)	
5-FU-based treatment										
ABCB1 1236 (rs1128503)										
– C/C	22 (32.8)	10 (45.5)	12 (54.5)	0.301	19 (86.4)	3 (13.6)	0.190	21 (95.5)	1 (4.5)	1
– C/T	32 (47.8)	21 (65.6)	11 (34.4)		20 (62.5)	12 (37.5)		32 (100)	0 (0)	
– T/T	13 (19.4)	8 (61.5)	5 (38.5)		9 (69.2)	4 (30.8)		12 (92.3)	1 (7.7)	
ABCB1 2667 (rs2032582)										
– G/G	26 (38.8)	12 (46.2)	14 (53.8)	0.312	21 (80.8)	5 (19.2)	0.353	25 (96.2)	1 (3.8)	1
– G/TA	29 (43.3)	20 (69)	9 (31)		19 (65.5)	10 (34.5)		29 (100)	0 (0)	
– T/T	12 (17.9)	7 (58.3)	5 (41.7)		8 (66.7)	4 (33.3)		11 (91.7)	1 (8.3)	
ABCB1 3435 (rs1045642)										
– C/C	21 (31.3)	11 (52.4)	10 (47.6)	0.734	19 (90.5)	2 (9.5)	0.037**	20 (95.2)	1 (4.8)	1
– C/T	32 (47.8)	20 (62.5)	12 (37.5)		21 (65.6)	11 (34.4)		32 (100)	0 (0)	
– T/T	14 (20.9)	8 (57.1)	6 (42.9)		8 (57.1)	6 (42.9)		13 (92.9)	1 (7.1)	
Adverse events were classified from grade 0 to IV using NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0.										
**p < 0.05.										
5-FU: 5-fluorouracil; HFS: Hand-foot syndrome										

Adverse events were classified from grade 0 to IV using NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0.

\*\* $p < 0.05$ .

5-FU: 5-fluorouracil; HFS: Hand-foot syndrome.

risk of developing neutropenia and HFS is clear. Being homozygous mutant or heterozygous for all the analyzed SNPs in the *ABCB1* gene results in a lower probability of moderate-to-severe neutropenia and moderate-to-severe HFS in a capecitabine-based treatment compared with CC homozygous. In contrast, possessing homozygous wild type means a lower probability of having moderate-to-severe diarrhea in a 5-FU-based treatment compared with heterozygous and homozygous TT.

The existence of a haplotype including the three mutations studied for the *ABCB1* gene has been reported with the wild-type called *ABCB1*\*1 and *ABCB1*\*2 for mutants [7]. Individuals that possess the haplotype \*2 express less p-glycoprotein resulting in less clearance of irinotecan [6]. Furthermore,

polymorphisms in *ABCB1* and *ABCC2* have been related to disposition of irinotecan and its metabolites, and the resulting toxicity and tumor response [15]. The fact that not one of the homozygous TT patients for any of the three SNPs analyzed in the *ABCB1* gene developed neutropenia grade II or above is highly relevant, even with the known limitation of the sample size. Bearing in mind the small sample size, the previously described association between neutropenia and *ABCB1* genotype in irinotecan-treated patients, and the higher proportion of irinotecan-treated patients in the capecitabine group (32% versus 17%), did make it seem that our results were affected by irinotecan. However, when irinotecan treatments were removed from the analysis, the association between rs1128503 and neutropenia

Table 4. Associations of *ABCB1* SNPs with adverse events in patients treated with capecitabine-based chemotherapy excluding combinations with irinotecan.

Genotype	Patients, n (%)	Neutropenia, n (%)			HFS, n (%)		
		0–I	II–IV	p-value	0–I	II–IV	p-value
ABCB1 1236							
C/C	13 (24)	9 (69.2)	4 (30.8)	0.045**	9 (69.2)	4 (30.8)	0.199
C/T	30 (55.6)	26 (86.7)	4 (13.3)		25 (83.3)	5 (16.7)	
T/T	11 (20.4)	11 (100)	0 (0)		10 (90.9)	1 (9.1)	
Adverse events were classified from grade 0 to IV using NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0.							
**p < 0.05.							
HFS: Hand–foot syndrome.							

Adverse events were classified from grade 0 to IV using NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0.

\*\*p < 0.05.

HFS: Hand-foot syndrome.

in capecitabine-treated patients was still statistically significant. Although statistical associations between rs1045642 and HFS in capecitabine-treated patients, and rs1045642 and diarrhea in 5-FU-treated patients were no longer apparent when irinotecan combinations were removed from the analysis, the percentage of patients in both cases remained highly similar, suggesting that the small number of patients included is the limiting factor in terms of finding statistical significance.

No relationship was established between capecitabine or 5-FU metabolism and *ABCB1*. However, other members of the same family (*ABCC3*, *ABCC4*, *ABCC5* and *ABCG2*) have recently been found to be related with the transport of 5-FU through the membrane [16,17]. Thus, the most logical explanation for the associations observed between *ABCB1* polymorphisms and fluoropyrimidine treatment is previously unknown participation of *ABCB1* in capecitabine- or metabolite-derived transport. The involvement of other polymorphisms in linkage disequilibrium with these SNPs, corresponding to a gene other than *ABCB1* but with a function related to the 5-FU/capecitabine pathways, could be also a possibility. Discovery of the described associations of SNPs in the *ABCB1* gene with toxicity in capecitabine-treated or 5-FU-treated patients

could be highly relevant to clinical practice. Other authors have tried to find associations between SNPs and toxicity in colorectal cancer patients treated with 5-FU-based chemotherapy in ten genes, including *ABCB1* [18]. They did not find statistical associations, probably because capecitabine-treated patients were not included and the toxicity criteria were different. In contrast, Glimelius *et al.* found that patients carrying the *ABCB1* 3435T/T genotype presented an increased risk of clinically relevant early toxicity when treated with 5-FU and irinotecan [11]. *ABCB1* polymorphisms were also tested as predictive biomarkers for chemotherapy efficacy for irinotecan and oxaliplatin in 5-FU-based treatment colorectal cancer patients with negative results [19]. rs1045642 was found to be associated with clinical outcomes after chemotherapy of paclitaxel combined with 5-FU in 43 advanced gastric cancer patients [20]. In 5-FU or capecitabine-treated patients, increased toxicity has been related to increased efficacy, such as in the case of DPYD and TYMS deficiency [21,22]. However, 5-FU-based therapy seems to increase toxicity and reduce efficacy, as was seen in a Swedish and Norwegian cohort [11]. Given the results obtained in this work, a study focusing on advanced colorectal cancer patients is needed to find out whether or not *ABCB1* genotype is related to progression in capecitabine-treated patients. These results could help oncologists select the best treatment possible by reducing adverse reactions associated with 5-FU or capecitabine. The potential clinical applications and the possible benefits to therapy open up a new area of study that needs to be validated with bigger cohorts.

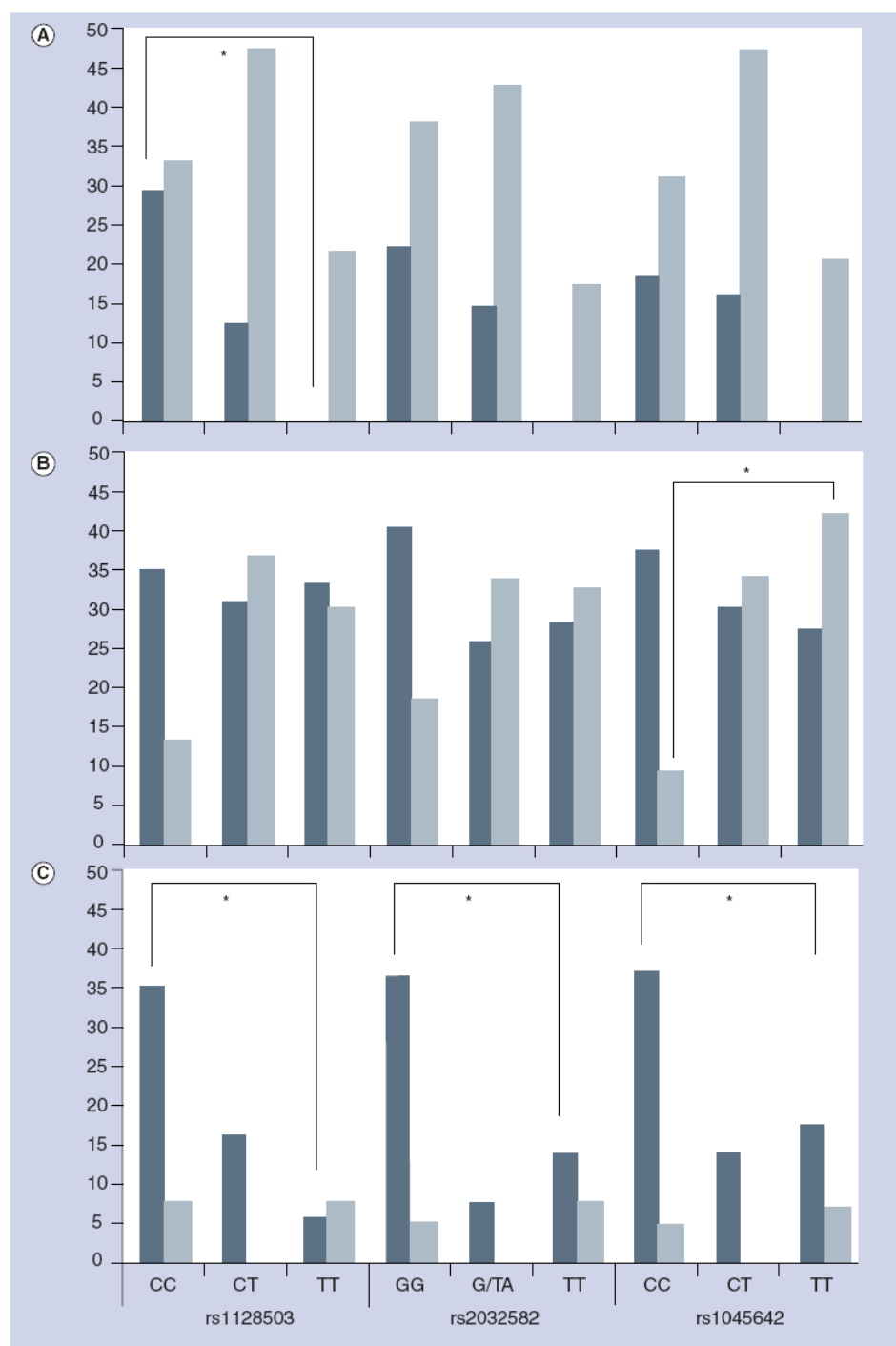
## Conclusion

Genetic variations in the *ABCB1* gene are related to incidences of neutropenia, diarrhea and HFS in fluoropyrimidine-treated colorectal cancer

Table 5. Associations of *ABCB1* SNPs with adverse events in patients treated with 5-fluorouracil-based chemotherapy excluding combinations with irinotecan.

Genotype	Patients, n (%)	Diarrhea, n (%)		
		0–I	II–IV	p-value
ABCB1 3435				
C/C	15 (34.28%%)	18 (90%)	2 (10%)	0.066
C/T	25 (65.71%)	21 (72.4%)	8 (27.6%)	
T/T	10 (28.57%)	8 (61.5%)	5 (38.5%)	
Adverse events were classified from grade 0 to IV using NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0.				

Adverse events were classified from grade 0 to IV using NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0.



**Figure 1.** Percentage of patients presenting with grade II neutropenia or above (A), diarrhea (B) and hand-foot syndrome (C) according to *ABCB1* genotype (rs1128503, rs2032582 and rs1045642) and treatment. Capecitabine-based treatment is represented in dark gray and 5-fluorouracil-based treatment in light gray.

\* $p < 0.05$

patients. Results need to be validated in a bigger population in order for this finding to be translated into clinical practice. This is also

the first genetic evidence of different toxicity to capecitabine/5-FU treatment in patients with colorectal cancer.



### Acknowledgements

The authors would like to thank Fernando Escolar for technical help, JM Bellón for statistical help and Nick Weber for English corrections.

### Financial & competing interests disclosure

Work was supported by grants to Luis A López-Fernández from 'Programa Miguel Servet FIS CP/00267', 'Fundación Mutua Madrileña' and 'Fundación Ramón Areces'. Jose L Jiménez was supported by FIS PI081495 and Programa de Investigación de la Consejería de Sanidad de la CAM. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a

financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

### Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

## Executive summary

### ABCB1 & colorectal cancer treatment

- Genetic variations in *ABCB1* have been associated with both toxicity and response to 5-fluorouracil (5-FU)-based treatment with contradictory results.
- This study investigates the correlation between the three most common *ABCB1* polymorphisms and adverse reactions differentiating 5-FU and capecitabine-treated colorectal cancer patients.

### ABCB1 polymorphisms & adverse reactions

- SNPs of *ABCB1* were found to be associated with moderate-to-severe neutropenia, hand-foot syndrome and diarrhea.
- Differences have been identified in capecitabine-based versus 5-FU-based treatment patients in terms of toxicity.
- These findings could be of potential interest in clinical practice for colorectal cancer patients prior to chemotherapy administration.

## Bibliography

Papers of special note have been highlighted as:

▪ of interest

▪▪ of considerable interest

- 1 Jemal A, Siegel R, Ward E *et al.*: Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J. Clin.* 56(2), 106–130 (2006).
- 2 Van Cutsem E, Twelves C, Cassidy J *et al.*: Oral capecitabine compared with intravenous fluorouracil plus leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: results of a large phase III study. *J. Clin. Oncol.* 19(21), 4097–4106 (2001).
- 3 Bhushan S, Mcleod H, Walko CM: Role of pharmacogenetics as predictive biomarkers of response and/or toxicity in the treatment of colorectal cancer. *Clin. Colorectal Cancer* 8(1), 15–21 (2009).
- 4 Schwab M, Zanger UM, Marx C *et al.*: Role of genetic and nongenetic factors for fluorouracil treatment-related severe toxicity: A prospective clinical trial by the german 5-FU toxicity study group. *J. Clin. Oncol.* 26(13), 2131–2138 (2008).
- Largest prospective study investigating 5-fluorouracil severe toxicity.
- 5 Romsicki Y, Sharom FJ: The atpase and ATP-binding functions of p-glycoprotein – modulation by interaction with defined phospholipids. *Eur. J. Biochem.* 256(1), 170–178 (1998).
- 6 Sai K, Kaniwa N, Iroda M *et al.*: Haplotype analysis of *ABCB1*/*MDR1* blocks in a Japanese population reveals genotype-dependent renal clearance of irinotecan. *Pharmacogenetics* 13(12), 741–757 (2003).
- 7 Kim RB, Leake BF, Choo EF *et al.*: Identification of functionally variant *MDR1* alleles among European Americans and African Americans. *Clin. Pharmacol. Ther.* 70(2), 189–199 (2001).
- 8 Panczyk M, Balcerzak E, Piaskowski S, Jamrozak K, Pasz-Walczak G, Mirowski M: *ABCB1* gene polymorphisms and haplotype analysis in colorectal cancer. *Int. J. Colorectal Dis* 24(8), 895–905 (2009).
- 9 Huang MY, Fang WY, Lee SC, Cheng TL, Wang JY, Lin SR: *ERCC2* 2251A>C genetic polymorphism was highly correlated with early relapse in high-risk stage II and stage III colorectal cancer patients: a preliminary study. *BMC Cancer* 8, 50 (2008).
- 10 De Iudicibus S, De Pellegrin A, Stocco G, Bartoli F, Bussani R, Decorti G: *ABCB1* gene polymorphisms and expression of p-glycoprotein and long-term prognosis in colorectal cancer. *Anticancer Res.* 28(6B), 3921–3928 (2008).
- 11 Glimelius B, Garmo H, Berglund A *et al.*: Prediction of irinotecan and 5-fluorouracil toxicity and response in patients with advanced colorectal cancer. *Pharmacogenomics J.* (2010) (Epub ahead of print).
- Complete study of toxicity and response to 5-fluorouracil and irinotecan combination.
- 12 Heo YS, Chang HM, Kim TW *et al.*: Hand-foot syndrome in patients treated with capecitabine-containing combination chemotherapy. *J. Clin. Pharmacol.* 44(10), 1166–1172 (2004).
- 13 Skof E, Rebersek M, Hlebanja Z, Ocvirk J: Capecitabine plus irinotecan (xeliri regimen) compared with 5-FU/lv plus irinotecan (folfiri regimen) as neoadjuvant treatment for patients with unresectable liver-only metastases of metastatic colorectal cancer: a randomised prospective phase II trial. *BMC Cancer* 9, 120 (2009).
- Comparison between folinic acid, 5-fluorouracil and irinotecan (FOLFIRI), and irinotecan and capecitabine, with no differences in terms of toxicity and efficacy.
- 14 Tam VC, Rask S, Koru-Sengul T, Dhesy-Thind S: Generalizability of toxicity data from oncology clinical trials to clinical practice: toxicity of irinotecan-based regimens in patients with metastatic colorectal cancer. *Curr. Oncol.* 16(6), 13–20 (2009).
- 15 Han JY, Lim HS, Yoo YK *et al.*: Associations of *ABCB1*, *ABCC2*, and *ABCG2* polymorphisms with irinotecan-pharmacokinetics and clinical outcome in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer* 110(1), 138–147 (2007).



- 16 Hagmann W, Jesnowski R, Faissner R, Guo C, Lohr JM: ATP-binding cassette c transporters in human pancreatic carcinoma cell lines. Upregulation in 5-fluorouracil-resistant cells. *Pancreatology* 9(1–2), 136–144 (2009).
- 17 Yuan J, Lv H, Peng B, Wang C, Yu Y, He Z: Role of BCRP as a biomarker for predicting resistance to 5-fluorouracil in breast cancer. *Cancer. Chemother. Pharmacol.* 63(6), 1103–1110 (2009).
- 18 Braun MS, Richman SD, Thompson L *et al.*: Association of molecular markers with toxicity outcomes in a randomized trial of chemotherapy for advanced colorectal cancer: The focus trial. *J. Clin. Oncol.* 27(33), 5519–5528 (2009).
- Study of ten putative pharmacogenetic biomarkers of toxicity to advanced colorectal cancer treatment.
- 19 Braun MS, Richman SD, Quirke P *et al.*: Predictive biomarkers of chemotherapy efficacy in colorectal cancer: results from the UK MRC focus trial. *J. Clin. Oncol.* 26(16), 2690–2698 (2008).
- 20 Chang H, Rha SY, Jeung HC *et al.*: Association of the *ABCB1* 3435C>T polymorphism and treatment outcomes in advanced gastric cancer patients treated with paclitaxel-based chemotherapy. *Oncol. Rep.* 23(1), 271–278 (2010).
- 21 Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V *et al.*: Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J.* 1(1), 65–70 (2001).
- 22 Morel A, Boisdron-Celle M, Fey L *et al.*: Clinical relevance of different dihydropyrimidine dehydrogenase gene single nucleotide polymorphisms on 5-fluorouracil tolerance. *Mol. Cancer Ther.* 5(11), 2895–2904 (2006).

#### ■ Websites

- 101 Common terminology criteria for adverse events v3.0 (CTCAE)  
[https://webapps.ctep.ncl.nih.gov/webobjsc/ctc/webhelp/welcome\\_to\\_ctcae.htm](https://webapps.ctep.ncl.nih.gov/webobjsc/ctc/webhelp/welcome_to_ctcae.htm)
- 102 US FDA  
[www.fda.gov](http://www.fda.gov)

## ANEXO 5

Cancer Chemother Pharmacol  
DOI 10.1007/s00280-013-2145-6

## ORIGINAL ARTICLE

## Differential toxicity biomarkers for irinotecan- and oxaliplatin-containing chemotherapy in colorectal cancer

Lucía Cortejoso · María I. García · Pilar García-Alfonso · Eva González-Haba · Fernando Escolar · María Sanjurjo · Luis A. López-Fernández

Received: 9 January 2013 / Accepted: 14 March 2013  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013

### Abstract

**Purpose** Oxaliplatin or irinotecan is usually administered jointly with fluoropyrimidines in colorectal cancer patients treated with chemotherapy. Both drugs have different toxicity patterns. Biomarkers for predicting high-risk severe adverse reactions can help select the best treatment.

**Methods** A retrospective analysis of 106 colorectal cancer patients receiving an oxaliplatin-based treatment and 56 receiving an irinotecan-based treatment was performed. One copy number variant (*GSTT1*) and nine polymorphisms in irinotecan and oxaliplatin metabolism, transport or DNA repair genes (*ABCB1*, *UGT1A1*, *XRCC1*, *ERCC1*, *ERCC2*, *GSTP1*) were genotyped by SNaPshot, polymerase chain reactions' length fragments, or copy number assays.

**Results** In irinotecan-treated patients, C allele of *ABCB1* C1236T SNP was associated with a lower risk of asthenia (OR = 0.043; 96 % CI = 0.004–0.444;  $P = 0.008$ ) and C allele of *ABCB1* C3435T SNP was associated with a lower risk of diarrhea (OR = 0.162; 95 % CI = 0.031–0.844;  $P = 0.031$ ); and individuals with two copies of *GSTT1* gene had a lower risk for asthenia (OR = 0.074; 95 % CI = 0.009–0.617;  $P = 0.016$ ). In oxaliplatin-treated patients, carriers of two C variants of Asn18Asn *ERCC1*

SNP had a lower risk for neutropenia (OR = 0.203; 95 % CI = 0.060–0.683;  $P = 0.01$ ).

**Conclusions** These biomarkers could help oncologists select the best treatment by reducing toxicity associated with irinotecan or oxaliplatin in colorectal cancer patients, thus increasing their quality of life.

**Keywords** Toxicity · Pharmacogenetics · Irinotecan · Oxaliplatin · Colorectal cancer

### Introduction


Colorectal cancer (CRC) is the second most common cancer among women after breast cancer and third among men after lung and prostate cancers, with 1.2 million new cases and over 600,000 deaths estimated in 2008 [1]. Treatment of this type of cancer has evolved considerably over the last decade thanks to chemotherapeutic agents such as fluoropyrimidines, oxaliplatin, irinotecan, and monoclonal antibodies such as cetuximab, panitumumab, and bevacizumab. The most common chemotherapeutic regimens for metastatic CRC involve the combination of either oxaliplatin or irinotecan together with fluoropyrimidines. Oxaliplatin may be combined with either 5 fluorouracil (5-FU) and leucovorin (FOLFOX) or with capecitabine, a 5-FU prodrug (XELOX). Irinotecan may also be combined with 5-FU and leucovorin (FOLFIRI) or with capecitabine (XELIRI) [2]. 5-FU and capecitabine inhibit thymidylate synthase. Oxaliplatin inhibits replication and transcription of DNA by binding both DNA and RNA and inducing apoptosis [3]. Irinotecan inhibits topoisomerase I, which induces transcription errors inhibiting cell proliferation [4].

Most patients experience toxicity at some point during their treatment, with a significant proportion experiencing

L. Cortejoso · M. I. García · E. González-Haba · F. Escolar · M. Sanjurjo · L. A. López-Fernández (✉)  
Servicio de Farmacia, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Doctor Esquerdo 46, 28007 Madrid, Spain  
e-mail: llopezf.hugm@salud.madrid.org

P. García-Alfonso  
Servicio de Oncología Médica, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Doctor Esquerdo 46, 28007 Madrid, Spain

Published online: 31 March 2013

 Springer

severe toxicity, which often leads to dose reductions, delays in treatment administration, and even withdrawal of treatment. In a minority of patients, toxicity may even lead to death [5, 6]. Additionally, some patients do not benefit from therapy, but are exposed to the adverse effects nonetheless [5]. Thus, while these drug combinations have significantly improved the prognosis of CRC, they have also increased the associated toxicity.

Inter-individual differences in toxicity profiles may be mediated in part through polymorphisms in metabolism, excretion, or transport genes [7]. Irinotecan and SN-38, its most active metabolite, are substrates for *ABCB1*, an efflux pump. Several polymorphisms have shown to be associated with a decrease of *ABCB1* protein level [8, 9] and are correlated with irinotecan toxicity [10]. *UGT1A1* catalyzes the glucuronidation of SN-38 to inactive SN-38G. A polymorphism consisting on a dinucleotide repeat TA in the promoter region, affecting transcription levels, and a G > A single nucleotide polymorphism (SNP) in -3156 position of *UGT1A1* gene have both been related to toxicity in irinotecan-treated patients [11, 12]. Enzymes involved in DNA repair and detoxification may be involved in response and toxicity to irinotecan and oxaliplatin. *GSTP1* and *GSTT1* are members of the glutathione S-transferase family and are involved in the detoxification pathway of several drugs, included oxaliplatin. The polymorphism rs1695 in *GSTP1* (Ile105Val) has been correlated to changes in the affinity of the enzyme for the substrate and to oxaliplatin-induced neuropathy [13, 14]. Copy number variants (CNVs) in *GSTT1* gene are frequent, and this fact could affect to mRNA expression and response to oxaliplatin [15, 16]. *ERCC1* participates in the pathway for repair of topoisomerase I-induced DNA damage in mammalian cells. The Asn118Asn SNP, which modifies the transcription level of *ERCC1*, has been correlated to protein levels and toxicity in colorectal cancer patients receiving an oxaliplatin-based regime [17]. Lys751Gln polymorphism in DNA repair gene *ERCC2* and rs25487 in *XRCC1* have previously been correlated with reduced DNA repair capacity and with toxicity to chemotherapy in CRC patients [15, 18].

Even if mechanisms of induced toxicity are not clear for several of these SNPs, identifying good biomarkers for predicting an individual patient's risk of toxicity could improve the quality of care, by providing high-risk patients with a reduced dose or an alternative drug [19]. Given that fluoropyrimidines are often combined with oxaliplatin or irinotecan, pharmacogenetic biomarkers predictive of toxicity to oxaliplatin-based and irinotecan-based chemotherapy would be of enormous interest to oncologists.

We undertook a retrospective pharmacogenetic study in a cohort of CRC patients treated with irinotecan or oxaliplatin-containing regimens. The aim of the study was to evaluate the possible associations between genomic

variations and adverse reactions. Therefore, we studied 9 DNA variations in genes involved in DNA repair (*XRCC1*, *ERCC1*, *ERCC2*), metabolism (*GSTP1*, *UGT1A1*) and transport (*ABCB1*), and the CNV in *GSTT1* gene. Many other polymorphisms have been analyzed regarding treatment-induced toxicity, specially for ABC family and DNA repair genes, but the 9 selected SNPs have been extensively studied and are well known.

## Materials and methods

### Patients

All patients were recruited from *Hospital General Universitario Gregorio Marañón* (Madrid, Spain) from January 2007 to December 2009. All patients met the following inclusion criteria: they were diagnosed with colorectal cancer in any stage, had received chemotherapy containing irinotecan or oxaliplatin in any line of treatment, were aged over 18 years, and had signed an informed consent form. Exclusion criteria were as follows: non-compliance with any of the inclusion criteria, performance status score higher than 2, kidney or liver damage prior to treatment, and less than 2 months of treatment unless adverse events grade 3 or higher occurred. The study was a retrospective analysis of 56 patients receiving an irinotecan-based treatment and 106 receiving an oxaliplatin-based treatment. Both patients on adjuvant treatment and with metastases were included in the study, as we were analyzing adverse events to chemotherapy.

The clinical data recorded were sex, age, type of cancer, performance status, treatment, and toxicity grades based on the Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0, CTCAE, for the following variables: nausea/vomiting, diarrhea, and mucositis (*gastrointestinal toxicity*); anemia, neutropenia, neutropenia febrile, leucopenia, and plaquetopenia (*hematological toxicity*); and peripheral neuropathy, anaphylaxis, hepatic toxicity, asthenia, anorexia, acneiform skin reaction, and hand-foot syndrome (HFS) (*other toxicity*). Associations between polymorphisms and adverse reactions were analyzed.

The research was in accordance with the Declaration of Helsinki and was approved by the Hospital ethics committee. Informed consent was obtained from all patients.

### DNA extraction

Genomic DNA from each enrolled patient was isolated from 200 µl of whole blood using the QiaAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). DNA concentration was measured in a NanoDrop spectrophotometer (ThermoScientific, MA, USA).



## Genotype analysis

Polymorphisms rs1045642 (*ABCB1* C3435T), rs2032582 (*ABCB1* G2677T/A) and rs1128503 (*ABCB1* C1236T), rs25487 (*XRCC1* Gln399Arg), rs11615 (*ERCC1* Asn118Asn), rs13181 (*ERCC2* Lys751Gln), rs10929302 (*UGT1A1* G3156A), rs1695 (*GSTP1* Ile105Val) were performed by SNaPshot. Multiplex polymerase chain reactions (PCR), purification, and SNaPshot were performed as previously described in [20]. The oligonucleotides used in the two multiplex PCR amplifications are shown in Table 1.

rs175347 (*UGT1A1*\*28) was genotyped using PCR amplification length polymorphism analysis with the primers (one of them labeled with 6-FAM) listed in Table 1 and capillary electrophoresis. Genomic DNA (20 ng) was used as a PCR template under the following conditions: 95 °C for 5 min, 35 cycles of 95 °C for 30 s, 60 °C for 40 s, 72 °C for 90 s, and a final extension of 72 °C for 5 min. PCR products were purified with ExoSapIt. Purified PCR product (1 µL) was loaded onto an ABI Prism 3100 Genetic Analyzer and analyzed using GeneMapper v3.2 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Copy number of the *GSTT1* gene was quantified using “TaqMan Copy Number Assays” according to manufacturer’s instructions (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

SNaPshot and PCR fragment length were validated by external Sanger sequencing. Validated samples were used as controls.

## Statistical analysis

All data were analyzed using the Statistical Package for the Social Sciences v.15 (SPSS, Inc). Fisher’s exact test and a linear-by-linear association chi-squared test were used to study the univariate associations between polymorphisms and grade of adverse events. A *P* value of <0.05 was considered statistically significant.

The odds ratio (OR) and 95 % confidence intervals (CI) were reported in the multivariate logistic regression models for associations that were statistically significant in the univariate analysis. Model selection included genotype, sex, performance status, and adjuvant or metastatic setting. Statistical power (SP) of significant associations in multivariate analysis was calculated using a two-tail test and a alpha error of confidence level of 10 %.

## Results

The clinical characteristics (median age, gender, performance status, cancer type, tumor stage, and other

chemotherapeutic agents used) are shown in Table 2. Patients were predominantly men (58.6 %), and median age at diagnosis was 64 years (38–85). Most of patients had a performance status of 0 and 1, and colon cancer was more prevalent than rectum cancer (65.4 and 34.6 %, respectively). The percentages of patients receiving 5-FU (51.8 % in irinotecan-treated patients vs. 58.5 % in oxaliplatin-treated patients) or capecitabine (39.3 % in irinotecan-treated patients vs. 37.7 % in oxaliplatin-treated patients) are very similar for irinotecan- or oxaliplatin-containing treatments. The new monoclonal antibodies bevacizumab, cetuximab, and panitumumab are more frequently combined with irinotecan (67.9, 23.2, and 1.8 %, respectively) than with oxaliplatin (27.4, 9.4, and 0.9 %, respectively), since irinotecan-containing regimens tend to be prescribed more frequently in patients with metastatic CRC as compared to oxaliplatin-containing regimens (96.4 vs. 60.4 %). All genotype frequencies were in Hardy–Weinberg equilibrium.

Oxaliplatin-containing treatments were slightly more toxic than irinotecan-containing treatments with regard to gastrointestinal and hematological toxicity (23.6 and 22.6 % vs. 17.9 and 19.6 %, respectively), whereas other toxicities were significantly more frequent when oxaliplatin was administered (40.6 vs. 25.0 %, respectively) (Table 3). Association analyses were performed between polymorphisms and highly frequent adverse reactions (>5 %).

We found 7 univariate statistically significant associations in irinotecan-containing regimens (Table 4): rs13181 (*ERCC2*) with diarrhea; rs1128503 (*ABCB1* 1236) with HFS, asthenia; rs2032582 (*ABCB1* 2677) with asthenia; rs1045642 (*ABCB1* 3435) with diarrhea, and HFS; and copy number variant of *GSTT1* and asthenia. Patients with the CC genotype for rs13181 (*ERCC2*) presented a higher rate of diarrhea and gastrointestinal toxicity (50 % in both cases) than patients with the CA or CC genotypes (19.4 and 4.8 % cases of diarrhea, respectively, and 22.6 and 4.8 % cases of gastrointestinal toxicity, respectively). With regard to the SNP rs1128503 (*ABCB1* 1236), individuals homozygous carriers of the C allele had a higher probability of HFS (21.4 %) and asthenia (35.7 %) than the other genotypes CT (0 and 3.7 %, respectively) and TT (0 % in all cases). Since HFS is a very common adverse reaction to capecitabine, we decided to exclude combinations of this prodrug with irinotecan in order to check whether the univariate associations found between *ABCB1* C1236T and *ABCB1* C3435T with HFS were influenced by capecitabine (combined with irinotecan in 39.3 % of patients). No patient of this subpopulation developed severe HFS during the treatment, demonstrating that this association was clearly due to the presence of the fluoropyrimidine within the chemotherapeutic regimen. A higher rate of asthenia

**Table 1** Identification of selected SNPs and sequence of the oligonucleotides used in the amplification

Gene	SNP ID	Forward primer	Reverse primer	SNaPshot primer	Technique
<i>XRCC1</i>	rs25487	TCTGACTCCCTCCAGATT	GCCCTCAGATCACACTA	GGCGTGTGAGCCCTTACCTC	SNAPSHOT 1
<i>ERCC2</i>	rs13181	GGCAAGACTCAGGAGTCACC	CCCTCTCCCTTTCCTCTGTT	AGCAGCTAGAAATCAGAGGACGCTG	SNAPSHOT 1
<i>ERCC1</i>	rs11615	TCCAGAACACTGGGACATGA	TCCCTATTGATGGCTTCTGC	AGGGGCAATCCCGTACTGAAGTTCTGCGCAA	SNAPSHOT 1
<i>GSTP1</i>	rs1695	CTCTATGGGAAGGACACAGC	GACAGCAGGGTCTCAAAA	CTTGCCCGCTCATAGTTGGTGTAGTAGGGGAGA	SNAPSHOT 1
<i>ABCB1</i>	rs1128503	CCTGACTCACCAACACAAATG	TATCCTGTGTCTGTGAATTGCC	GCCCACTCTGCACCTTCAGGTTTCAG	SNAPSHOT 2
<i>ABCB1</i>	rs2032582	TAGTTTGACTCACCTTCCCGG	GGCTATAGGTTCCAGGCTTG	GACAAGCACTGAAGATAAGAAAGAACTAGAAGGT	SNAPSHOT 2
<i>ABCB1</i>	rs1045642	CATGCTCCACAGGCTGTTAT	GTAACCTTGGCAGTTTCAGTG	TGACTCGATGAAGGCATGTA GTTGGCCCTC	SNAPSHOT 2
<i>UGT1A1</i>	rs10929302	CAAAGGAAGTTTGGGGAACA	CACCACCACCTTCTGGAACCT	CTTGTGCCCCCTCAC	SNAPSHOT 2
<i>UGT1A1</i>	rs8175347	TCACGTGACACAGTCAAAACATT	CAGCATGGGACACCACTG	GGTAAGAGGCAGAGGGAGGGGCAAGCAAGG	SNAPSHOT 2
<i>GSTT1</i>	CNV			GCTAGAGAGGAGGAATGAGCTT	PCR length product
SNP single-nucleotide polymorphism, CNV copy number variation					

(23.8 %) was suffered by patients with the GG genotype for rs2032582 (*ABCB1* 2677) compared with the GT (4.3 %) and TT (0 %) genotypes. With respect to SNP rs1045642 (*ABCB1* 3435), individuals homozygous carriers of the C allele had a higher probability of diarrhea (35.3 %) and HFS (17.6 %) than the other genotypes CT (11.1 and 0 %, respectively) and TT (0 % in both cases). The results also show that the presence of 2 copies of the *GSTT1* gene decreases the probability of severe asthenia (6 %) in comparison with just one copy or no copies of this gene (50 % in both cases).

In the univariate analysis with oxaliplatin-based treatments, SNP rs11615 (*ERCC1*) was found statistically significantly associated with grade 3/4 neutropenia (Table 4). Patients with the CC genotype for rs11615 (*ERCC1*) presented higher rates of neutropenia (43.8 %) than patients with the CT and TT genotypes (17.4 and 13.6 %, respectively).

All these associations were analyzed in a multivariate analysis by linear regression including other factors (sex, performance status, and adjuvant or metastatic setting) as variables (Table 5). Three of the associations found in the sample of patients treated with irinotecan-based regimens were confirmed by this analysis: rs1128503 (*ABCB1* 1236) and CNV of *GSTT1* with asthenia (CC vs. CT/TT: OR = 0.043; 95 % CI = 0.004–0.444; *P* = 0.008; SP = 91.2 % and OR = 0.074; 95 % CI = 0.009–0.617; *P* = 0.016; SP = 85.7 %, respectively), and rs1045642 (*ABCB1* 3435) with diarrhea (CC vs. CT/TT: OR = 0.162; 95 % CI = 0.031–0.844; *P* = 0.031; SP = 65.7 %). In patients treated with oxaliplatin-containing regimens, the association between rs11615 (*ERCC1*) with neutropenia was confirmed in the multivariate analysis (CC vs. CT/TT: OR = 0.205; 95 % CI = 0.061–0.690; *P* = 0.010; SP = 79.2 %).

## Discussion

Identification of predictive biomarkers for toxicity to irinotecan- or oxaliplatin-containing treatments could help oncologists select the best option to avoid severe adverse reactions to chemotherapy in CRC patients and adjust dose. Several genotype-directed methods for dose adaptation in CRC patients have been proposed to increase response and/or reduce toxicity to 5-FU [21] or irinotecan [22]. We present an in-depth pharmacogenetic analysis of 9 polymorphisms and one CNV in 7 genes involved in either DNA repair systems or the metabolic routes of oxaliplatin or irinotecan and their association with toxicity in CRC patients treated with these chemotherapeutic agents.

Irinotecan or oxaliplatin are normally combined with 5-FU or with its prodrug capecitabine to treat colon and

**Table 2** Main characteristics of patients

Parameter	Irinotecan, <i>n</i> (%)	Oxaliplatin, <i>n</i> (%)
Patients		
Men	33 (58.9 %)	62 (58.5 %)
Women	23 (41.1 %)	44 (41.5 %)
Total	56	106
Median age (years)		
Men	64	67
Women	63	64
Total	63	65
Performance status		
Men		
0	15 (45.5 %)	34 (54.8 %)
1	16 (48.5 %)	25 (40.3 %)
>1	2 (6.1 %)	3 (4.8 %)
Women		
0	13 (56.5 %)	29 (65.9 %)
1	10 (43.5 %)	14 (31.8 %)
>1	0 (0 %)	1 (2.3 %)
Total		
0	28 (50 %)	63 (59.4 %)
1	26 (46.4 %)	39 (36.8 %)
>1	2 (3.6 %)	4 (3.8 %)
Type of cancer		
Men		
Colon	16 (48.5 %)	42 (67.7 %)
Rectum	17 (51.5 %)	20 (32.3 %)
Women		
Colon	18 (78.3 %)	30 (68.2 %)
Rectum	5 (21.7 %)	14 (31.8 %)
Total		
Colon	34 (60.7 %)	72 (67.9 %)
Rectum	22 (39.3 %)	34 (32.1 %)
Grade of tumor		
I	0 (0 %)	1 (0.9 %)
II	0 (0 %)	12 (11.3 %)
III	2 (3.6 %)	29 (27.4 %)
IV	54 (96.4 %)	64 (60.4 %)
Treatment setting		
Adjuvant	6 (10.7 %)	62 (58.5 %)
Metastatic		
1st line	30 (53.6 %)	28 (36.4 %)
2nd line	20 (35.7 %)	16 (15.1 %)
Other drugs		
5-FU	29 (51.8 %)	62 (58.5 %)
Capecitabine	22 (39.3 %)	40 (37.7 %)
Cetuximab	13 (23.2 %)	10 (9.4 %)
Bevacizumab	38 (67.9 %)	29 (27.4 %)
Panitumumab	1 (1.8 %)	1 (0.9 %)
Raltitrexed	0 (0 %)	4 (3.8 %)

**Table 3** Severe adverse reactions to irinotecan and oxaliplatin in colorectal cancer patients

Adverse reaction grade 3/4	Irinotecan, <i>n</i> (%)	Oxaliplatin, <i>n</i> (%)
Gastrointestinal toxicity	10 (17.9)	25 (23.6)
Nausea/vomiting	2 (3.6)	5 (4.7)
Diarrhea	9 (16.1)	18 (17)
Mucositis	2 (3.6)	3 (2.8)
Hematological toxicity	11 (19.6)	24 (22.6)
Anemia	1 (1.8)	0 (0.0)
Neutropenia	9 (16.1)	21 (19.8)
Neutropenia febrile	0 (0.0)	2 (1.9)
Leucopenia	2 (3.6)	3 (2.8)
Thrombocytopenia	0 (0.0)	2 (1.9)
Other toxicity	14 (25.0)	43 (40.6)
Peripheral neuropathy	0 (0.0)	13 (12.3)
Anaphylaxis	0 (0.0)	3 (2.8)
Hepatic toxicity	1 (1.8)	5 (4.7)
Asthenia	6 (10.7)	13 (12.3)
Anorexia	2 (3.6)	3 (2.8)
Acneiform skin reaction	6 (10.7)	4 (3.8)
Hand-foot syndrome <sup>a</sup>	3 (5.4)	12 (11.3)

Adverse events were classified from grade 0 to 5 using NCI Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0

<sup>a</sup> Grade  $\geq 2$

rectum cancers with a similar effectivity. However, with regard to the toxicity profile, irinotecan causes more severe nausea and vomiting, while the most frequent oxaliplatin-specific adverse reaction is peripheral neuropathy [23]. We found that grade 3/4 gastrointestinal toxicity was a little more frequent in the group of patients treated with oxaliplatin than in the group of patients receiving irinotecan-based treatments, but these differences were not statistically significant (data not shown).

Eight associations were identified after univariate analysis, and four of them were preserved after multivariate logistic regression analysis. Sex, performance status, and adjuvant or metastatic setting were included as variables in the multivariate analysis because of their association with the toxicity profile in previous works [24–27].

*ABCB1* gene is a member of the ABC superfamily and codes for the P-glycoprotein (P-gp), which is the most studied transporter related to irinotecan [28]. We found that two variants in *ABCB1* were associated with reduced risk of severe adverse reactions. T allele of *ABCB1* C1236T (rs1128503) conferred a significantly lower risk for asthenia in CRC patients receiving an irinotecan-based regime. The T allele of *ABCB1* C3435T (rs1045642) also conferred a significantly lower risk for diarrhea and HFS in patients treated with irinotecan. Homozygous CC for *ABCB1* C3435T have been associated with a twofold



**Table 4** Statistically significantly univariate associations between genotypes and toxicities

Gene (SNP ID)	Genotype	ADR grade		P value	ADR
		0–2	3–4		
Irinotecan-based treatment					
<i>ERCC2</i> (rs13181)	AA	20 (95.2 %)	1 (4.8 %)	0.033	Diarrhea
	CA	25 (80.6 %)	6 (19.4 %)		
	CC	2 (50 %)	2 (50 %)		
<i>ABCB1</i> 1236 (rs1128503)	CC	11 (78.6 %)	3 (21.4 %)	0.013	HFS
	CT	27 (100 %)	0 (0 %)		
	TT	15 (100 %)	0 (0 %)		
<i>ABCB1</i> 1236 (rs1128503)	CC	9 (64.3 %)	5 (35.7 %)	0.002	Asthenia
	CT	26 (96.3 %)	1 (3.7 %)		
	TT	15 (100 %)	0 (0 %)		
<i>ABCB1</i> 2677 (rs2032582)	GG	16 (76.2 %)	5 (23.8 %)	0.021	Asthenia
	GT	22 (95.7 %)	1 (4.3 %)		
	TT	12 (100 %)	0 (0 %)		
<i>ABCB1</i> 3435 (rs1045642)	CC	11 (64.7 %)	6 (35.3 %)	0.010	Diarrhea
	CT	24 (88.9 %)	3 (11.1 %)		
	TT	12 (100 %)	0 (0 %)		
<i>ABCB1</i> 3435 (rs1045642)	CC	14 (81.4 %)	3 (17.6 %)	0.032	HFS
	CT	27 (100 %)	0 (0 %)		
	TT	12 (100 %)	0 (0 %)		
<i>GSTT1</i> (CNV)	0	2 (50 %)	2 (50 %)	0.010	Asthenia
	1	1 (50 %)	1 (50 %)		
	2	47 (94 %)	3 (6 %)		
Oxaliplatin-based treatment					
<i>ERCC1</i> (rs11615)	CC	9 (56.3 %)	7 (43.8 %)	0.026	Neutropenia
	CT	38 (82.6 %)	8 (17.4 %)		
	TT	38 (86.4 %)	6 (13.6 %)		

ADR adverse drug reaction, SNP single-nucleotide polymorphism, CNV copy number variation, HFS hand-foot syndrome (grade  $\geq 2$ )

**Table 5** Statistically significantly multivariate associations between genotypes and toxicities

Variable	OR	95 % CI	P value
<b>Irinotecan-based treatment</b>			
<b>Asthenia</b>			
<i>ABCB1</i> 1236			
CT/TT versus CC	0.047	0.004–0.493	0.011
<i>GSTT1</i> (CNV)			
2 versus 0/1 copies	0.093	0.011–0.794	0.030
<b>Diarrhea</b>			
<i>ABCB1</i> 3435			
CT/TT versus CC	0.177	0.034–0.919	0.039
<b>Oxaliplatin-based treatment</b>			
<b>Neutropenia</b>			
<i>ERCC1</i>			
CT/TT versus CC	0.205	0.061–0.690	0.010

OR odds ratio, CI confidence interval, CNV copy number variant

higher ABCB1 protein expression levels compared with the TT genotype [29, 30]. Given that C1236T, G2677A/T and C3435T SNPs are in linkage disequilibrium, correlation between TT genotype expression found in C3435T can be extrapolated to the other SNPs [31]. For this reason,

individuals with the CC genotype would be expected to have twofold higher drug efflux which would result in higher drug concentrations in intestinal cells and, in turn, induce diarrhea. Results confirmed this hypothesis in our population of irinotecan-treated patients. *ABCB1* C1236T has been associated with grade 3–4 toxicity in metastatic CRC patients treated with FOLFIRI. Irinotecan-based CRC-treated patients with the C allele develop higher rates of diarrhea, nausea and vomiting, neutropenia, neutropenic sepsis, dyspnea, deep vein thrombosis, and fatigue [32]. This protective effect of TT genotypes in *ABCB1* gene seems to be also extended to non-gastrointestinal adverse reactions: univariate analysis revealed a protective effect of TT genotypes with regard to the development of HFS (*ABCB1* C1236T and *ABCB1* C3435T), and asthenia (*ABCB1* C1236T). Consistent with these results, in a previous work of our group about polymorphisms in *ABCB1* associated to toxicity in fluoropyrimidine-treated CRC patients, we also found that patients carriers of the C allele of *ABCB1* C1236T and C3435T receiving a capecitabine-based treatment developed more mid-to-severe HFS and neutropenia than patients homozygous TT [20]. For this reason, a new study was done excluding XELIRI-treated patients and no patients in this subpopulation developed

severe HFS during the treatment, demonstrating that this association was likely due to the presence of the fluoropyrimidine within the chemotherapeutic regimen. Other studies have failed to establish any associations between these SNPs in *ABCB1* and toxicity induced by irinotecan-containing regimens or found the opposite relationship [10, 33]. It is difficult to compare the pharmacogenetics of adverse reactions to chemotherapeutic agents, mainly due to differences in the methodology of the existing studies [7]. The fact that patients receiving an irinotecan-containing regime had a more advanced stage of the disease than patients receiving an oxaliplatin-containing regime did not interfere with our results, since our objective was to evaluate toxicity, not efficacy.

The multivariate analysis also revealed a lower risk of severe asthenia in patients with two copies of *GSTT1* than patients with the null genotype or one copy of the gene in patients receiving an irinotecan-based regime (OR = 0.074; 95 % CI = 0.009–0.617;  $P = 0.016$ ). Glutathione S-transferases (GSTs) are enzymes responsible for detoxification of platinum and of potential carcinogens through glutathione conjugation [34]. *GSTT1* is a member of this family of enzymes, and it is known to play a role in the detoxification of oxaliplatin. However, the *GSTT1*-null genotype has been shown to predict toxicity associated to FOLFIRI regimens in advanced CRC patients [35]. The authors of this study found a significant association between the *GSTT1*-null genotype and the development of gastrointestinal toxicity grade 3. The lack of the *GSTT1* gene also implies greater toxicity for chemotherapy administered in acute myeloid leukemia patients [36] and also in lung cancer patients [37]. These results suggest that *GSTT1* might be involved in the metabolic pathway of several drugs, apart from oxaliplatin.

We found a statistically significant relationship between rs11615 in *ERCC1* and neutropenia in CRC patients treated with and oxaliplatin-based treatment. A lower risk of neutropenia was observed in patients with CT and TT variants at rs11615 in *ERCC1* as compared to patients with the CC variant. Excision repair cross-complementation proteins (ERCC) are involved in nucleotide repair systems. Polymorphisms in these genes could contribute to interindividual differences in toxicity to oxaliplatin. It has been suggested that variations of *ERCC1* at rs11615 affect the mRNA of *ERCC1*, with CC carriers possessing lower *ERCC1* activity. [38, 39]. Accordingly, CC carriers would be expected to have reduced capacity for DNA repair and thus experience increased oxaliplatin toxicity. Our results are consistent with this hypothesis. These results are also consistent with the study by Boige et al. [15], who found that CC carriers were more likely to develop hematological toxicity, even though Boige's results were not statistically significant.

It has been shown that *ERCC1* participates in a pathway for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage in

mammalian cells [17]. Given the activity of irinotecan against topoisomerase I, *ERCC1* might be expected to play a role in irinotecan-mediated toxicity. Consistent with this, *ERCC1* polymorphism rs11615 was associated with mucositis in irinotecan-treated patients.

Peripheral neuropathy, the most common adverse reaction to oxaliplatin, was not related to the *ERCC1* genotype in our cohort of patients, as found by other authors [14, 40, 41]. Inada et al. associated the mutant allele T with early grade 1 neuropathy in CRC patients receiving an oxaliplatin-based regimen, although no association was found with higher grades of neuropathy [14].

*ERCC2* also participates in the nucleotide-excision repair system, acting against the damage induced by oxaliplatin [42]. Gln variant for rs13181 (*ERCC2* Lys751Gln) has been related with an alteration of mRNA secondary structure. This change confers a lower stability of mRNA and a decreased *ERCC2* protein level [43]. A lower DNA repair capacity and a higher toxicity have been described for Gln individuals [15, 19, 44]. A higher hematological toxicity has been previously observed in FOLFOX-treated Gln/Gln patients [15]. However, other authors failed to find any association between this SNP and toxicity (reviewed in [7]). Participation of *ERCC2* in topoisomerase I-induced DNA damage has not been described. However, polymorphisms in this gene have been extensively studied concerning to response and toxicity to irinotecan-containing treatments and influence cannot be discarded [19, 45, 46]. The association of this SNP with severe diarrhea found in our univariate study in irinotecan-treated patients is coherent with this hypothesis.

The *UGT1A1* polymorphisms analyzed (*UGT1A1*\*28 and *UGT1A1*3156) were not statistically associated with toxicity in our sample of patients, contrary to what other authors have found [10–12, 47–59]. The fact that the association between *UGT1A1*\*28 and toxicity did not reach statistical significance may be a result of the small sample size for the irinotecan-treated patients and also of the lower doses of irinotecan administered to our patients in comparison with other regimens (180 mg/m<sup>2</sup>). It is known that hematological toxicity induced by irinotecan depends on its dose [60] and most of the studies which find associations between *UGT1A1*\*28 and irinotecan-induced toxicity include patients receiving doses higher than 180 mg/m<sup>2</sup>. Braun et al. [19] and Boige et al. [15] also failed to show any correlation between *UGT1A1*\*28 and toxicity using doses of irinotecan of 180 mg/m<sup>2</sup>.

The rest of SNPs analyzed in *XRCC1*, *GSTP1*, and *UGT1A1* genes were not statistically significantly associated with severe adverse reactions to oxaliplatin- or irinotecan-based chemotherapy. For each of them, controversial results have been described in the literature (reviewed in [7]). The limitations of the study, mainly small sample size,



especially for irinotecan-based regimen patients, and the heterogeneity of the population with respect to treatment setting (both adjuvant and metastatic) could affect final results. Therefore, these results need to be validated in a larger prospective validation series.

Other limitations include the possible effect of the combined drugs in the toxicity profile, especially fluoropyrimidines. Concerning this point, these patients are actually included in a larger study on pharmacogenetics of toxicity to fluoropyrimidines and none presented the most toxicity-related biomarker, the allele *DPYD\*2A*.

We present a complete pharmacogenetic profile of DNA variations related to adverse events in CRC patients treated with irinotecan or oxaliplatin-containing regimens. Four associations between polymorphisms and adverse events were statistically significant and provide new data in the field of toxicity to chemotherapeutic agents administered in patients with CRC.

## Conclusions

Overall, the SNPs rs1128503 (*ABCB1* 1236), CNV of *GSTT1*, and rs1045642 (*ABCB1* 3435) were found to be associated with adverse events in patients with CRC treated with irinotecan-containing regimens, and rs11615 (*ERCC1*) with neutropenia in patients treated with oxaliplatin-containing regimens. To our knowledge, this is the first study to find associations between rs1128503 (*ABCB1* 1236) and CNV of *GSTT1* with asthenia, and rs11615 (*ERCC1*) with neutropenia.

These new exploratory findings, which need to be confirmed in a larger population, could help oncologists select either oxaliplatin or irinotecan depending on patients' genotype in order to reduce toxicity associated with these drugs in CRC patients, thus increasing their quality of life.

**Acknowledgments** Work was supported by a grant from Instituto de Salud Carlos III (PI12/00056) and "Programa Miguel Servet CP/0267" to Luis A. López-Fernández. The authors would like to thank the Sequencing Facility from "Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón" for technical help, and Braden Lang for editorial assistance.

**Conflict of interest** The authors of this manuscript declare that they have no competing interests.

## References

- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011) Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61:69–90
- Kelly H, Goldberg RM (2005) Systemic therapy for metastatic colorectal cancer: current options, current evidence. *J Clin Oncol* 23:4553–4560
- Raymond E, Faivre S, Woynarowski JM, Chaney SG (1998) Oxaliplatin: mechanism of action and antineoplastic activity. *Semin Oncol* 25:4–12
- Iyer L, Ratain MJ (1998) Clinical pharmacology of camptothecins. *Cancer Chemother Pharmacol* 42(Suppl):S31–S43
- Chua W, Kho PS, Moore MM, Charles KA, Clarke SJ (2011) Clinical, laboratory and molecular factors predicting chemotherapy efficacy and toxicity in colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 79:224–250
- Fuchs CS, Moore MR, Harker G, Villa L, Rinaldi D, Hecht JR (2003) Phase III comparison of two irinotecan dosing regimens in second-line therapy of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 21:807–814
- Cortezoso L, Lopez-Fernandez LA (2012) Pharmacogenetic markers of toxicity for chemotherapy in colorectal cancer patients. *Pharmacogenomics* 13:1173–1191
- Taheri M, Mahjoubi F, Omranipour R (2010) Effect of MDR1 polymorphism on multidrug resistance expression in breast cancer patients. *Genet Mol Res* 9:34–40
- Vaclavikova R, Nordgard SH, Alnaes GI, Hubackova M, Kubala E, Kodet R, Mrhalova M, Novotny J, Gut I, Kristensen VN, Soucek P (2008) Single nucleotide polymorphisms in the multidrug resistance gene 1 (*ABCB1*): effects on its expression and clinicopathological characteristics in breast cancer patients. *Pharmacogenet Genomics* 18:263–273
- Glimelius B, Garmo H, Berglund A, Fredriksson LA, Berglund M, Kohnke H, Bystrom P, Sorbye H, Wadelius M (2011) Prediction of irinotecan and 5-fluorouracil toxicity and response in patients with advanced colorectal cancer. *Pharmacogenomics* 11:61–71
- Shulman K, Cohen I, Bamett-Griness O, Kuten A, Gruber SB, Lejbkowitz F, Rennert G (2011) Clinical implications of UGT1A1\*28 genotype testing in colorectal cancer patients. *Cancer* 117:3156–3162
- Innocenti F, Undevia SD, Iyer L, Chen PX, Das S, Kocherginsky M, Karrison T, Janisch L, Ramirez J, Rudin CM, Vokes EE, Ratain MJ (2004) Genetic variants in the UDP-glucuronosyl-transferase 1A1 gene predict the risk of severe neutropenia of irinotecan. *J Clin Oncol* 22:1382–1388
- Karam RA, Pasha HF, El-Shal AS, Rahman HM, Gad DM (2012) Impact of glutathione-S-transferase gene polymorphisms on enzyme activity, lung function and bronchial asthma susceptibility in Egyptian children. *Gene* 497:314–319
- Inada M, Sato M, Morita S, Kitagawa K, Kawada K, Mitsuma A, Sawaki M, Fujita K, Ando Y (2010) Associations between oxaliplatin-induced peripheral neuropathy and polymorphisms of the *ERCC1* and *GSTP1* genes. *Int J Clin Pharmacol Ther* 48:729–734
- Boige V, Mendiboure J, Pignon JP, Lorient MA, Castaing M, Barrois M, Malka D, Tregouet DA, Bouche O, Le Corre D, Miran I, Mulot C, Ducreux M, Beaune P, Laurent-Puig P (2010) Pharmacogenetic assessment of toxicity and outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with LV5FU2, FOLFOX, and FOLFIRI: FFCD 2000–05. *J Clin Oncol* 28:2556–2564
- Goekkurt E, Al-Batran SE, Hartmann JT, Mogck U, Schuch G, Kramer M, Jaeger E, Bokemeyer C, Ehninger G, Stoecklacher J (2009) Pharmacogenetic analyses of a phase III trial in metastatic gastroesophageal adenocarcinoma with fluorouracil and leucovorin plus either oxaliplatin or cisplatin: a study of the Arbeitsgemeinschaft internistische onkologie. *J Clin Oncol* 27:2863–2873
- Zhang YW, Regairaz M, Seiler JA, Agama KK, Doroshow JH, Pommier Y (2011) Poly(ADP-ribose) polymerase and XPF-ERCC1 participate in distinct pathways for the repair of topoisomerase I-induced DNA damage in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 39:3607–3620

18. Stoecklacher J, Ghaderi V, Iobal S, Groshen S, Tsao-Wei D, Park D, Lenz HJ (2001) A polymorphism of the XRCC1 gene predicts for response to platinum based treatment in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res* 21:3075–3079
19. Braun MS, Richman SD, Thompson L, Daly CL, Meade AM, Adlard JW, Allan JM, Parmar MK, Quirke P, Seymour MT (2009) Association of molecular markers with toxicity outcomes in a randomized trial of chemotherapy for advanced colorectal cancer: the FOCUS trial. *J Clin Oncol* 27:5519–5528
20. Gonzalez-Haba E, Garcia MI, Cortezoso L, Lopez-Lillo C, Barneco N, Garcia-Alfonso P, Alvarez S, Jimenez JL, Martin ML, Munoz-Fernandez MA, Sanjurjo M, Lopez-Fernandez LA (2010) ABCB1 gene polymorphisms are associated with adverse reactions in fluoropyrimidine-treated colorectal cancer patients. *Pharmacogenomics* 11:1715–1723
21. Tan BR, Thomas F, Myerson RJ, Zehnbauser B, Trinkaus K, Malyapa RS, Mutch MG, Abbey EE, Alyasiry A, Flesman JW, McLeod HL (2011) Thymidylate synthase genotype-directed neoadjuvant chemoradiation for patients with rectal adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 29:875–883
22. Marcuello E, Paez D, Pare L, Salazar J, Sebio A, del Rio E, Baiget M (2011) A genotype-directed phase I–IV dose-finding study of irinotecan in combination with fluorouracil/leucovorin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *Br J Cancer* 105:53–57
23. Tournigand C, Andre T, Achille E, Lledo G, Flesh M, Mery-Mignard D, Quinaux E, Couteau C, Buyse M, Ganem G, Landi B, Colin P, Louvet C, de Gramont A (2004) FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 22:229–237
24. Gordon MA, Zhang W, Yang D, Iqbal S, El-Khouiry A, Nagashima F, Lurje G, Labonte M, Wilson P, Sherrod A, Ladner RD, Lenz HJ (2011) Gender-specific genomic profiling in metastatic colorectal cancer patients treated with 5-fluorouracil and oxaliplatin. *Pharmacogenomics* 12:27–39
25. Sanoff HK, Sargent DJ, Campbell ME, Morton RF, Fuchs CS, Ramanathan RK, Williamson SK, Findlay BP, Pitot HC, Goldberg RM (2008) Five-year data and prognostic factor analysis of oxaliplatin and irinotecan combinations for advanced colorectal cancer: N9741. *J Clin Oncol* 26:5721–5727
26. Sargent DJ, Kohne CH, Sanoff HK, Bot BM, Seymour MT, de Gramont A, Porschen R, Saltz LB, Rougier P, Tournigand C, Douillard JY, Stephens RJ, Grothey A, Goldberg RM (2009) Pooled safety and efficacy analysis examining the effect of performance status on outcomes in nine first-line treatment trials using individual data from patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 27:1948–1955
27. Freyer G, Rougier P, Bugat R, Droz JP, Marty M, Bleiberg H, Mignard D, Awad L, Herait P, Culine S, Trillet-Lenoir V (2000) Prognostic factors for tumour response, progression-free survival and toxicity in metastatic colorectal cancer patients given irinotecan (CPT-11) as second-line chemotherapy after 5FU failure. CPT-11 F205, F220, F221 and V222 study groups. *Br J Cancer* 83:431–437
28. Jansen WJ, Hulscher TM, van Ark-Otte J, Giaccone G, Pinedo HM, Boven E (1998) CPT-11 sensitivity in relation to the expression of P170-glycoprotein and multidrug resistance-associated protein. *Br J Cancer* 77:359–365
29. Lin JH, Yamazaki M (2003) Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 42:59–98
30. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, Brinkmann U (2000) Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3473–3478
31. Panczyk M, Balcerzak E, Piskowski S, Jamrozak K, Pasz-Walczak G, Mirowski M (2009) ABCB1 gene polymorphisms and haplotype analysis in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 24:895–905
32. Rhodes KE, Zhang W, Yang D, Press OA, Gordon M, Vallbohmer D, Schultheis AM, Lurje G, Ladner RD, Fazzone W, Iqbal S, Lenz HJ (2007) ABCB1, SLCO1B1 and UGT1A1 gene polymorphisms are associated with toxicity in metastatic colorectal cancer patients treated with first-line irinotecan. *Drug Metab Lett* 1:23–30
33. Han JY, Lim HS, Yoo YK, Shin ES, Park YH, Lee SY, Lee JE, Lee DH, Kim HT, Lee JS (2007) Associations of ABCB1, ABCC2, and ABCG2 polymorphisms with irinotecan-pharmacokinetics and clinical outcome in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer* 110:138–147
34. Hayes JD, Pulford DJ (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30:445–600
35. Romero RZ, Morales R, Garcia F, Huariz M, Bandres E, De la Haba J, Gomez A, Aranda E, Garcia-Foncillas J (2006) Potential application of GSTT1-null genotype in predicting toxicity associated to 5-fluorouracil irinotecan and leucovorin regimen in advanced stage colorectal cancer patients. *Oncol Rep* 16:497–503
36. Davies SM, Robison LL, Buckley JD, Tjoa T, Woods WG, Radloff GA, Ross JA, Perentesis JP (2001) Glutathione S-transferase polymorphisms and outcome of chemotherapy in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 19:1279–1287
37. Sweeney C, Nazar-Stewart V, Stapleton PL, Eaton DL, Vaughan TL (2003) Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms and survival among lung cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:527–533
38. Koc E, Caner V, Buyukpinarbasili N, Tepeli E, Turk NS, Ozan Cetin G, Bagci G (2012) The determination of relationship between “excision repair cross-complementing group 1” (ERCC1) gene T19007C and C8092A single nucleotide polymorphisms and clinicopathological parameters in non-small cell lung cancer. *Mol Biol Rep* 39:375–380
39. Yu JJ, Lee KB, Mu C, Li Q, Abernathy TV, Bostick-Bruton F, Reed E (2000) Comparison of two human ovarian carcinoma cell lines (A2780/CP70 and MCAS) that are equally resistant to platinum, but differ at codon 118 of the ERCC1 gene. *Int J Oncol* 16:555–560
40. Chen YC, Tzeng CH, Chen PM, Lin JK, Lin TC, Chen WS, Jiang JK, Wang HS, Wang WS (2010) Influence of GSTP1 I105V polymorphism on cumulative neuropathy and outcome of FOLFOX-4 treatment in Asian patients with colorectal carcinoma. *Cancer Sci* 101:530–535
41. Chua W, Goldstein D, Lee CK, Dhillon H, Michael M, Mitchell P, Clarke SJ, Iacopetta B (2009) Molecular markers of response and toxicity to FOLFOX chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 101:998–1004
42. Sung P, Bailly V, Weber C, Thompson LH, Prakash L, Prakash S (1993) Human xeroderma pigmentosum group D gene encodes a DNA helicase. *Nature* 365:852–855
43. Wolfe KJ, Wickliffe JK, Hill CE, Paolini M, Ammenheuser MM, Abdel-Rahman SZ (2007) Single nucleotide polymorphisms of the DNA repair gene XPD/ERCC2 alter mRNA expression. *Pharmacogenet Genomics* 17:897–905
44. Hansen RD, Sorensen M, Tjonneland A, Overvad K, Wallin H, Raaschou-Nielsen O, Vogel U (2007) XPA A23G, XPC Lys939Gln, XPD Lys751Gln and XPD Asp312Asn polymorphisms, interactions with smoking, alcohol and dietary factors, and risk of colorectal cancer. *Mutat Res* 619:68–80
45. Artac M, Bozcuk H, Pehlivan S, Akcan S, Pehlivan M, Sever T, Ozdogan M, Savas B (2010) The value of XPD and XRCC1



- genotype polymorphisms to predict clinical outcome in metastatic colorectal carcinoma patients with irinotecan-based regimens. *J Cancer Res Clin Oncol* 136:803–809
46. Ruzzo A, Graziano F, Loupakis F, Santini D, Catalano V, Bissonni R, Ficarelli R, Fontana A, Andreoni F, Falcone A, Canestrari E, Tonini G, Mari D, Lippe P, Pizzagalli F, Schiavon G, Alessandrini P, Giustini L, Maltese P, Testa E, Menichetti ET, Magnani M (2008) Pharmacogenetic profiling in patients with advanced colorectal cancer treated with first-line FOLFIRI chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 8:278–288
  47. McLeod HL, Sargent DJ, Marsh S, Green EM, King CR, Fuchs CS, Ramanathan RK, Williamson SK, Findlay BP, Thibodeau SN, Grothey A, Morton RF, Goldberg RM (2010) Pharmacogenetic predictors of adverse events and response to chemotherapy in metastatic colorectal cancer: results from North American Gastrointestinal Intergroup Trial N9741. *J Clin Oncol* 28:3227–3233
  48. Iyer L, Das S, Janisch L, Wen M, Ramirez J, Karrison T, Fleming GF, Vokes EE, Schilsky RL, Ratain MJ (2002) UGT1A1\*28 polymorphism as a determinant of irinotecan disposition and toxicity. *Pharmacogenomics J* 2:43–47
  49. Marcuello E, Altes A, Menoyo A, Del Rio E, Gomez-Pardo M, Baiget M (2004) UGT1A1 gene variations and irinotecan treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 91:678–682
  50. Martinez-Balibrea E, Abad A, Martinez-Cardus A, Gines A, Valladares M, Navarro M, Aranda E, Marcuello E, Benavides M, Massuti B, Carrato A, Layos L, Manzano JL, Moreno V (2010) UGT1A and TYMS genetic variants predict toxicity and response of colorectal cancer patients treated with first-line irinotecan and fluorouracil combination therapy. *Br J Cancer* 103:581–589
  51. Massacesi C, Terrazzino S, Marcucci F, Rocchi MB, Lippe P, Bissonni R, Lombardo M, Pilone A, Mattioli R, Leon A (2006) Uridine diphosphate glucuronosyl transferase 1A1 promoter polymorphism predicts the risk of gastrointestinal toxicity and fatigue induced by irinotecan-based chemotherapy. *Cancer* 106:1007–1016
  52. Rouits E, Charasson V, Petain A, Boisdron-Celle M, Delord JP, Fonck M, Laurand A, Poirier AL, Morel A, Chatelut E, Robert J, Gamelin E (2008) Pharmacokinetic and pharmacogenetic determinants of the activity and toxicity of irinotecan in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 99:1239–1245
  53. Biason P, Masier S, Toffoli G (2008) UGT1A1\*28 and other UGT1A polymorphisms as determinants of irinotecan toxicity. *J Chemother* 20:158–165
  54. Cecchin E, Innocenti F, D'Andrea M, Corona G, De Mattia E, Biason P, Buonadonna A, Toffoli G (2009) Predictive role of the UGT1A1, UGT1A7, and UGT1A9 genetic variants and their haplotypes on the outcome of metastatic colorectal cancer patients treated with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan. *J Clin Oncol* 27:2457–2465
  55. Cote JF, Kirzin S, Kramar A, Mosnier JF, Diebold MD, Soubeyran I, Thirouard AS, Selves J, Laurent-Puig P, Ychou M (2007) UGT1A1 polymorphism can predict hematologic toxicity in patients treated with irinotecan. *Clin Cancer Res* 13:3269–3275
  56. Kweekel DM, Gelderblom H, Van der Straaten T, Antonini NF, Punt CJ, Guchelaar HJ (2008) UGT1A1\*28 genotype and irinotecan dosage in patients with metastatic colorectal cancer: a Dutch Colorectal Cancer Group study. *Br J Cancer* 99:275–282
  57. Liu CY, Chen PM, Chiou TJ, Liu JH, Lin JK, Lin TC, Chen WS, Jiang JK, Wang HS, Wang WS (2008) UGT1A1\*28 polymorphism predicts irinotecan-induced severe toxicities without affecting treatment outcome and survival in patients with metastatic colorectal carcinoma. *Cancer* 112:1932–1940
  58. Innocenti F, Kroetz DL, Schuetz E, Dolan ME, Ramirez J, Relling M, Chen P, Das S, Rosner GL, Ratain MJ (2009) Comprehensive pharmacogenetic analysis of irinotecan neutropenia and pharmacokinetics. *J Clin Oncol* 27:2604–2614
  59. Ferraldeschi R, Minchell LJ, Roberts SA, Tobi S, Hadfield KD, Blackhall FH, Mullanitha S, Wilson G, Valle J, Saunders M, Newman WG (2009) UGT1A1\*28 genotype predicts gastrointestinal toxicity in patients treated with intermediate-dose irinotecan. *Pharmacogenomics* 10:733–739
  60. Hoskins JM, Goldberg RM, Qu P, Ibrahim JG, McLeod HL (2007) UGT1A1\*28 genotype and irinotecan-induced neutropenia: dose matters. *J Natl Cancer Inst* 99:1290–1295

## ANEXO 6

### Producción científica: Artículos publicados y comunicaciones a congresos nacionales e internacionales

#### Artículos publicados

· González-Haba E, García MI, Cortejoso L, López-Lillo C, Barrueco N, García-Alfonso P, Álvarez S, Jiménez JL, Martín ML, Muñoz-Fernández MA, Sanjurjo M, López-Fernández LA. *ABCB1 gene polymorphisms are associated with adverse reactions in fluoropyrimidine-treated colorectal cancer patients*. Pharmacogenomics (2010) 11(12), 1715-1723. Factor de impacto 3,876. (Cuartil 1, Pharmacology and Pharmacy 44/249).

· Fernández-Rozadilla C, Cazier JB, Moreno V, Crous-Bou M, Guinó E, Durán G, Lamas MJ, López R, Candamio S, Gallardo E, Paré L, Baiget M, Páez D, López-Fernández LA, Cortejoso L, García MI, Bujanda L, González D, Gonzalo V, Rodrigo L, Reñé JM, Jover R, Brea-Fernández A, Andreu M, Bessa X, Llor X, Xicola R, Palles C, Tomlinson I, Catellví-Bel, Castells A, Ruiz-Ponte C, Carracedo A. *Pharmacogenomics in colorectal cancer: a genome-wide association study to predict toxicity after 5-fluorouracil or FOLFOX administration*. Pharmacogenomics J, (2012). doi: 10.1038/tpj.2012.2. Factor de impacto 4,306. (Cuartil 1, Pharmacology and Pharmacy 36/249).

· Lucía Cortejoso, Luis A. López-Fernández. *Pharmacogenetic markers of toxicity to chemotherapy in colorectal cancer patients*. Pharmacogenomics (2012) 13(10), 1173-91. Factor de impacto 3,974. (Cuartil 1, Pharmacology and Pharmacy 45/259).

· Lucía Cortejoso, María I. García, Pilar García-Alfonso, Eva González-Haba, Fernando Escolar, María Sanjurjo, Luis A. López-Fernández. *Differential toxicity biomarkers for irinotecan- and oxaliplatin-containing chemotherapy in colorectal cancer*. En edición en Cancer Chemotherapy and Pharmacology. Factor de impacto 2,833. (Cuartil 2, Pharmacology and Pharmacy 92/259).

### **Comunicaciones a congresos**

AUTORES: P. García Alfonso, A. Muñoz Martín, M. Blanco Codesido, S. Custodio Cabello, A. Rupérez Blanco, D. López-Trabada Ataz, M. Martín Jiménez, L. Cortejoso-Fernández, I. García-García, S. Manrique-Rodríguez, L.A. López-Fernández

TÍTULO: *Pharmacogenetic biomarkers for predisposition to toxicity with irinotecan or oxaliplatin-containing regimens in colorectal cancer patients*

CONGRESO: 1st International Congress on Controversies in Personalized Oncology (CONPO). 7 – 10 marzo 2013. Barcelona

MODALIDAD: Póster

AUTORES: L. Cortejoso-Fernández, M. I. García-García, P. García-Alfonso, E. González-Haba, M. Sanjurjo-Sáez, L. A. López-Fernández

TÍTULO: Biomarcadores farmacogenéticos de toxicidad a regímenes quimioterápicos en cáncer colorrectal

CONGRESO: XVIII Congreso Nacional de Hospitales y Gestión de Hospitales. 20 – 22 febrero 2013. Bilbao

MODALIDAD: Premio a la mejor comunicación oral del área 9 “Caminando hacia la medicina personalizada”

AUTORES: L. Cortejoso-Fernández, M. I. García-García, P. García-Alfonso, E. González-Haba, M. Sanjurjo-Sáez, L. A. López-Fernández

TÍTULO: Biomarcadores farmacogenéticos de toxicidad a regímenes quimioterápicos basados en oxaliplatino o irinotecan en cáncer colorrectal

CONGRESO: II Jornadas de Investigación del Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón. 21 febrero 2013. Madrid

MODALIDAD: Póster

AUTORES: L. Cortejoso-Fernández, M. I. García-García, P. García-Alfonso, S. Manrique-Rodríguez, L. A. López-Fernández

TÍTULO: *Pharmacogenetic biomarkers for predisposition to toxicity with irinotecan or oxaliplatin-containing regimens in colorectal cancer patients*

CONGRESO: 47th American Society of Hospital Pharmacists (ASHP) Midyear Clinical Meeting and Exhibition. 2 – 6 diciembre 2012. Las Vegas, Estados Unidos

MODALIDAD: Póster

AUTORES: L. Cortejoso-Fernández, M. I. García-García, E. González-Haba, P. García-Alfonso, A. Herranz-Alonso, M. Sanjurjo-Sáez, L. A. López-Fernández

TÍTULO: *Pharmacogenetic biomarkers for predisposition to toxicity to adjuvant FOLFOX/XELOX in colorectal cancer*

CONGRESO: 41st ESCP Symposium on Clinical Pharmacy. 29 – 31 octubre 2012. Barcelona

MODALIDAD: Comunicación oral

AUTORES: Pilar García Alfonso, Andrés J. Muñoz, Montse Blanco Codeisido, Daniel López-Trabada Ataz, Lucía Cortejo-so-Fernández, María Isabel García-García, Eva González-Haba, María Sanjurjo-Sáez, Miguel Martín, Luis A. López-Fernández

TÍTULO: *Pharmacogenetic biomarkers for predisposition to toxicity to adjuvant FOLFOX/XELOX in colorectal cancer*

CONGRESO: Annual 12' Meeting American Society of Clinical Oncology (ASCO). 11 – 5 junio 2012. Chicago. Estados Unidos

MODALIDAD: Póster

AUTORES: L. Cortejo-so-Fernández, M. I. García-García, E. González-Haba, P. García-Alfonso, M. Sanjurjo-Sáez, L. A. López-Fernández

TÍTULO: *Pharmacogenetic biomarkers for predisposition to toxicity in colorectal cancer patients*

CONGRESO: 46th American Society of Hospital Pharmacists (ASHP) Midyear Clinical Meeting and Exhibition. 4 – 8 diciembre 2011. Nueva Orleans, Estados Unidos

MODALIDAD: Póster

AUTORES: L. Cortejo-so-Fernández, M.I. García-García, E. González-Haba, M. Martín-Barbero, P. García-Alfonso, M. Sanjurjo-Sáez, L.A. López-Fernández

TÍTULO: Biomarcadores farmacogenéticos de toxicidad en cáncer colorrectal

CONGRESO: I Jornadas de Investigación del Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón. 14 diciembre 2011. Madrid

MODALIDAD: Póster

AUTORES: Lucía Cortejo-so Fernánde-z, María Isabel García García, Eva González-Haba Peña, María Luisa Martín Barbero, María Norberta Sánchez Fresneda, Pilar García Alfonso, Sonsoles Álvarez, Fernando Escolar Antúnez, María Sanjurjo Sáez, Luis Andrés López Fernández

TÍTULO: Biomarcadores farmacogenéticos de toxicidad en cáncer colorrectal

CONGRESO: V Congreso de la Sociedad Española de Farmacogenética y Farmacogenómica. 3 y 4 octubre 2011. Pamplona

MODALIDAD: Póster

AUTORES: L. Cortejo-so-Fernández, M.I. García-García, E. González-Haba, P. García-Alfonso, M.N. Sánchez-Fresneda, M.L. Martín-Barbero, M. Sanjurjo-Sáez, L.A. López-Fernández

TÍTULO: *New pharmacogenetic biomarkers for predisposition to toxicity in colorectal cancer patients*

CONGRESO: 16th Congress of the European Association of Hospital Pharmacists. 30 marzo – 1 abril 2011. Viena

MODALIDAD: Comunicación oral

AUTORES: González-Haba Peña E, García García I, Cortejoso Fernández L, García Alfonso P, Sanjurjo Sáez M, López Fernández L

TÍTULO: Asociación de polimorfismos de ADN con efectos adversos al tratamiento quimioterápico en pacientes con cáncer colorrectal

CONGRESO: 55 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria. 19 – 22 octubre 2010. Madrid

MODALIDAD: Póster

AUTORES: Cortejoso Fernández L, García García M.I, González-Haba Peña E, García Alfonso P, Sánchez Fresneda M.N, López-Fernández L

TÍTULO: Identificación de nuevos marcadores farmacogenéticos asociados a neutropenia con el tratamiento de 5-fluorouracilo o capecitabina en pacientes con cáncer colorrectal

CONGRESO: 55 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria. 19 – 22 octubre 2010. Madrid

MODALIDAD: Póster

AUTORES: Lucía Cortejoso, María Isabel García, Eva González-Haba, Pilar García-Alfonso, María Sanjurjo, Luis A. López-Fernández

TÍTULO: Papel de los transportadores de unión a ATP en las reacciones adversas al tratamiento quimioterápico con fluoropirimidinas

CONGRESO: IV Congreso de la Sociedad Española de Farmacogenética y Farmacogenómica. 2 y 3 septiembre 2010. Pamplona

MODALIDAD: Comunicación oral

AUTORES: Eva González-Haba, María I. García, Lucía Cortejoso, Pilar García-Alfonso, Sonsoles Álvarez, José L. Jiménez, María L. Martín, María A. Muñoz-Fernández, María Sanjurjo, Luis A. López-Fernández

TÍTULO: *The pharmacogenetics of colorectal cancer: a global point of view*

CONGRESO: Pharmacogenetics and Pharmacogenomics: Practical Applications in Routine Medical Practice. 6 – 11 junio 2010. Sant Feliu de Guixols, Gerona

MODALIDAD: Póster